Die Bindung von ß-Rezeptorenblockern an Humanserumalbumin, Plasmaproteine, Erythrozyten und Vollblut in Abhängigkeit von ihrer Lipophilie

Detlef Schulz
aus Düsseldorf

Frankfurt am Main
1983

Aus dem
Zentrum der Pharmakologie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

Die Bindung von ß-Rezeptorenblockern an Humanserumalbumin, Plasmaproteine, Erythrozyten und Vollblut in Abhängigkeit von ihrer Lipophilie

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin
des Fachbereiches Humanmedizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Detlef Schulz
aus Düsseldorf

Frankfurt am Main
1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Prof. Dr. med. H. J. Müller

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. D. Hellenbrecht

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. med. R. Hopf

Tag der mündlichen Prüfung : 29.6.1983

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	6
2.1. Konzentrationsbereich	7
2.2. Dialysiergerät	10
2.3. Membran	12
2.4. Versuchsbedingungen	15
2.5. Analytik	17
2.6. Voruntersuchungen	19
2.6.1. Bestimmung der Konzentrationsabhängigkeit der Extinktion	19
2.6.2. Bestimmung der Dialysierzeit	20
2.6.3. Bestimmung der Membranbindung	22
2.6.4. Bestimmung der Konzentrationsabhängigkeit der Membranbindung	23
2.6.5. Bestimmung von Membranbestandteilen	24
2.6.6. Bestimmung des Albuminübertritts	25
2.6.7. Bestimmung des Plasmaproteinübertritts	26
2.6.8. Bestimmung des Vollblutübertritts	27
2.7. Bindungsstudien	28
2.7.1. Bestimmung der Albuminbindung	28
2.7.2. Bestimmung der Plasmaproteinbindung	29
2.7.3. Bestimmung der Vollblutbindung	31
2.8. Rechnerische Auswertung	33
2.9. Verteilungskoeffizienten	34
2.10. Verwendete Substanzen	37
2.11. Statistische Auswertung	38

Seite

3. Ergebnisse 39
3.1. Ergebnisse aus den Voruntersuchungen 39
3.1.1. Bestimmung der Membranbindung 39
3.1.2. Bestimmung der Konzentrationsabhängigkeit der Membranbindung 41
3.2. Ergebnisse der Bindungsstudien 43
3.2.1. Bindung an Humanserumalbumin 43
3.2.2. Bindung an Plasmaproteine 47
3.2.3. Bindung an Vollblut 50
3.3. Berechnete Bindung an Erythrozyten 57
3.4. Bindung an Blutbestandteile im Kompartiment Vollblut 60
3.5. Lipophilie der ß-Rezeptorenblocker 63
3.6. Korrelation zwischen Lipophilie und Bindung 66

4. Diskussion der Ergebnisse 68
4.1. Zur Methodik 68
4.2. Ergebnisse der Bindungsstudien 70

5. Zusammenfassung 81

6. Literaturverzeichnis 83

1. Einleitung

Die ß-Rezeptorenblocker sind typische Vertreter einer Substanzklasse, bei denen sich die einzelnen Substanzen weniger durch ihre pharmakodynamischen, als vielmehr pharmakokinetischen Eigenschaften unterscheiden. Abgeleitet vom Isoprenalin-Molkül handelt es sich bei den meisten ß-Rezeptorenblockern um Aryl-oxypropanol-amine, die sich auf Grund ihrer chemischen Struktur in eine homologe Reihe einordnen lassen. Innerhalb dieser homologen Reihe lassen sich zahlreiche Gesetzmäßigkeiten der ß-Rezeptorenblocker im Verhalten zu biologischen Membranstrukturen anhand ihrer unterschiedlichen physiko-chemischen Eigenschaften aufzeigen, doch sind viele pharmako-kinetischen Untersuchungen über ß-Rezeptorenblocker in vivo-Studien, bei denen meist nur eine Substanz isoliert untersucht wird; ein direkter Vergleich der pharmakokinetischen Eigenschaften der verschiedenen ß-Rezeptorenblcoker aber fehlt häufig: So können die ß-Rezeptorenblocker sehr hoch oder nur gering an Proteine gebunden werden, ihr Verteilungsvolumen reicht von 0,7 bis 5 l/kg (Heel und Avery, 1980), die Serumhalbwertszeit kann sehr kurz (2 Std. bei Oxprenolol) oder sehr lang sein (16-24 Std. bei Nadolol). Sie können nahezu vollständig metabolisiert (Propranolol), oder fast vollständig unverändert ausgeschieden werden (Nadolol) (Übersicht bei Lemmer, 1982).

Eine der wesentlichen Ursachen für Unterschiede in solchen pharmakokinetischen Eigenschaften ist die Lipidlöslichkeit von Pharmaka (Raaflaub, 1970, Krieglstein, 1973, Kubinyi, 1979), die z.B. durch die im Octanol/

Puffer-System erhaltenen Verteilungskoeffizienten ausgedrückt werden kann (Hansch und Fujita, 1964, Leo et al., 1971, Hansch und Dunn, 1972), und als Modell für die Interaktion Pharmakon-Biophase gilt.

So unterliegen ß-Rezeptorenblocker mit hoher Lipidlöslichkeit (bzw. hohem Verteilungskoeffizienten) in aller Regel einem "first-pass-Metabolismus" in der Leber, reichern sich im Zentralnervensystem an (Neil-Dwyler et al., 1981), und werden in hohem Ausmaß an Plasmaproteine gebunden (Übersichten bei Regård, 1975, Cruickshank, 1980).

Die unspezifische Bindung der ß-Rezeptorenblocker an Eiweiße ist in diesem Zusammenhang von zentraler Bedeutung (Scholtan, 1963, Krieglstein, 1969, Krieglstein, 1973, v. Schwarzenfeld, 1974), wobei die Bindung an Humanserumalbumin bisher als die wesentlichste Proteinbindung angesehen wurde (Krieglstein, 1969, Koch-Weser und Sellers, 1976). Im allgemeinen bezeichnet man den ungebundenen Anteil eines Pharmakons als pharmakologisch aktiv, denn nur der ungebundene Pharmakonanteil kann frei diffundieren und sich in Gewebe und Biophasen verteilen. Im Verteilungsgleichgewicht muß die Konzentration des ungebundenen Pharmakonanteils im Gewebswasser, Zellwasser und Plasmawasser gleich sein, vorausgesetzt, das Pharmakon kann durch die biologischen Membranen frei diffundieren. Die Konzentration an freiem Arzneimittel im Plasma ist somit auch ein Maß für die Konzentration an freiem Arzneimittel in den übrigen Teilräumen des Körpers, in die das Arzneimittel eindringen kann (Scholtan, 1978).

Im Kompartiment Vollblut, das in dieser Arbeit untersucht werden soll, bedeutet das u.a., daß auch an und innerhalb der Erythrozyten-Biophase ein bestimmter Anteil an ß-Rezeptorenblocker vorliegen muß, der ganz beträchtlich (Evans et al., 1973, Lowenthal et al., 1974), teilweise sogar größer als die Plasmabindung sein kann (Taylor und Turner, 1981). Eine Berechnung kinetischer Parameter ohne Berücksichtigung der Aufnahme durch die Erythrozyten kann deshalb nur zu ungenauen Ergebnissen führen (Hughes et al., 1975). Die bisher vorliegenden Daten zur Bindung an Erythrozyten aber sind Einzelbefunde und erlauben keine generalisierende Aussage für die Gesamtheit aller möglichen ß-Rezeptorenblocker. In der vorliegenden Arbeit soll deshalb in der Form einer quantitativen Struktur-Wirkungs-Beziehung untersucht werden, wie sich die verschiedenen ß-Rezeptorenblocker an Humanserumalbumin und Plasmaproteine binden, sowie im Vollblut in die Kompartimente Erythrozyten, Plasmaproteine und Plasmawasser verteilen.

Von Scholtan (1963), Krieglstein (1969) und mehreren anderen Autoren wurde als Ursache für die Bindung lipophiler Pharmaka eine hydrophobe Wechselbeziehung beschrieben. Der Mechanismus dieser hydrophoben Wechselbeziehung einerseits, sowie die Häufigkeit hydrophober Gruppen in Arzneimittelmolekülen andererseits erklären die mit der Lipophilie ansteigende Affinität von Arzneimitteln zu Makromolekülen und die damit verbundene pharmakologische Bedeutung der Lipophilie (Krieglstein, 1973). Bereits in zahlreichen früheren Untersuchungen konnten Korrelationen zwischen den unterschiedlichen physiko-chemischen Eigenschaften der Vertreter der

homologen Reihe der ß-Rezeptorenblocker und deren in vitro und in vivo festgestellten unterschiedlichen unspezifischen Membranwirkungen aufgezeigt werden (Lemmer et al., 1972, Wiethold et al., 1973, Hellenbrecht und Müller, 1973, Hellenbrecht et al., 1973, Hellenbrecht et al., 1974, Hellenbrecht und Gortner, 1976). Hingegen waren derzeit keine ausreichenden Bindungsstudien an intakten Zellstrukturen durchgeführt worden.

Es wurden daher für die vorliegende Untersuchung fünf ß-Rezeptorenblocker (Atenolol, Practolol, Pindolol, Propranolol und Carazolol) ausgesucht, die das gesamte Spektrum der derzeit verfügbaren ß-Rezeptorenblocker bezüglich des lipophilen Verhaltens repräsentativ abdecken, und mit denen überprüft werden sollte, welche Beziehungen sich zwischen der unterschiedlichen Hydrophilie/Lipophilie der ß-Rezeptorenblocker und deren Verteilungsverhalten in den einzelnen Kompartimenten des menschlichen Blutes erkennen lassen. Auch die Natur der Bindungen an die verschiedenen Blutbestandteile sollte ermittelt werden.

Da bei den drei großen kardiovaskulären Indikationsgebieten Hypertonie, koronare Herzkrankheit und Herzrhythmusstörungen nur das linksdrehende Enantiomer eines ß-Rezeptorenblockers wirksam ist (Übersicht bei Lemmer, 1982), und auch pharmakokinetische Parameter zwischen den beiden Enantiomeren des ß-Rezeptorenblockers Propranolol signifikant unterschiedlich sind (Lemmer und Bathe, 1979a, Lemmer und Bathe, 1979b, Lemmer und Bathe, 1982), war es von Interesse herauszufinden, ob sich die Enantiomere auch in ihrer Bindung an Blutbestandteile unterscheiden. Es wurden deshalb auch die beiden Enantio-

mere d- und l-Propranlol neben dem Razemat in die vorliegende Untersuchung mit einbezogen.

Die Bindungsstudien der vorliegenden Arbeit wurden mit der Gleichgewichtsdialyse im Dianorm^{R}-System durchgeführt. Die Gleichgewichtsdialyse weist gegenüber anderen Methoden zur Bestimmung der Eiweißbindung (Eleketrophorese, Gelchromatographie, Ultrafiltration oder Ultrazentrifugation) den Vorteil auf, daß mit geringem apparativem Aufwand verläßliche quantitative Daten erhalten werden können. Ein weiterer Vorteil ist, daß hierfür nur geringe Mengen (500 µl bis 1 ml) von Blut oder Blutzellsuspensionen, bzw. Plasma oder Humanserumalbuminlösungen benötigt werden. Die Inkubationstechnik geht schnell und erlaubt anhand der Bestimmung der Plasmabindung und Blutbindung die Berechnung der Bindung an verschiedene Blutzellsysteme (Ehrnebo et al., 1974). Zudem können die Versuchsbedingungen weitgehend den physiologischen Gegebenheiten entsprechend gestaltet werden.

Da für die vorliegenden Untersuchungen keine radioaktiv markierten Substanzen verwendet werden konnten, mußten aufgrund meßmethodischer Gegebenheiten die ß-Rezeptorenblocker in einem Dosisbereich untersucht werden, der in vivo nur bei Überdosierungen oder Intoxikationen auftreten kann. Eine Beziehung zwischen den in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Bindungswerten und daraus abgeleitete Schlußfolgerungen beschränken sich daher auf solche klinischen Situationen.

2. Material und Methoden

Die Gleichgewichtsdialyse ist eine Methode, die es gestattet, Daten zur Eiweißbindung von Pharmaka zu gewinnen und dadurch Bindungsmechanismen quantitativ zu charakterisieren. Das Dialyseverfahren nutzt die Erscheinung aus, daß in einer eiweißhaltigen Lösung nur derjenige Anteil des Pharamakons frei durch die Membran diffundieren kann, welcher nicht an Eiweiß gebunden ist. Im Gleichgewichtszustand muß die Konzentration an ungebundener Substanz deshalb auf beiden Seiten der Membran gleich sein. Wird nach Abschluß der Dialyse eine geringere Menge an freiem Pharmakon gefunden, als eingesetzt wurde, so ist das durch die Bindung des Pharmakons an das Eiweiß bedingt.

Von dem Gedanken ausgehend, daß der Konzentrationsbereich, in dem die Bindungen der ß-Rezeptorenblocker an Eiweiße gemessen werden sollte, sich möglichst an physiologischen, bzw. therapeutischen Dimensionen orientieren sollte, wurde versucht, die untersuchten Stoffkonzentrationen möglichst klein zu halten. Die Grenzen, in denen dieses Vorhaben realisiert werden konnte, waren durch die analytische Methode gegeben.

2.1. Konzentrationsbereich

Von den zu untersuchenden ß-Rezeptorenblockern (Abbildung 1) wurden Lösungen in Form von Verdünnungsreihen hergestellt, und die Extinktion im ultravioletten Strahlenbereich der einzelnen Verdünnungsstufen mit einem Photometer bestimmt. Es wurde schließlich ein Konzentrationsbereich gefunden, der bei allen fünf (bzw. sieben) untersuchten Substanzen gleich lag, um einerseits einen direkten Vergleich der ß-Rezeptorenblocker untereinander zu ermöglichen und dessen niedrigste Konzentration andererseits photometrisch noch analytisch korrekt zu erfassen war. Dieser Konzentrationsbereich erstreckte sich von $3 \cdot 10^{-5}$ bis $5 \cdot 10^{-3}$ Mol pro Liter, entsprechend:

Atenolol: $0{,}798 \cdot 10^{4}$ bis $1{,}331 \cdot 10^{6}$ ng/ml
Practolol: $0{,}798 \cdot 10^{4}$ bis $1{,}331 \cdot 10^{6}$ ng/ml
Pindolol: $0{,}745 \cdot 10^{4}$ bis $1{,}241 \cdot 10^{6}$ ng/ml
Propranolol u.
Enantiomere: $0{,}778 \cdot 10^{4}$ bis $1{,}296 \cdot 10^{6}$ ng/ml
Carazolol: $0{,}895 \cdot 10^{4}$ bis $1{,}491 \cdot 10^{6}$ ng/ml
(Angaben jeweils für die Basen).

Einzelmessungen wurden jeweils für folgende Konzentrationen vorgenommen: $3 \cdot 10^{-4}$, $5 \cdot 10^{-4}$, $7 \cdot 10^{-4}$, $1 \cdot 10^{-3}$, $2 \cdot 10^{-3}$, $3 \cdot 10^{-3}$, und $5 \cdot 10^{-3}$ Mol/l. Eine Ausnahme bildete hier Carazolol, das wegen seiner ausgeprägten Lipophilie und den daraus resultierenden Löslichkeitseigenschaften nur in einem Konzentrationsbereich von $3 \cdot 10^{-4}$ bis $1 \cdot 10^{-3}$ Mol/l untersucht werden konnte.

Als Lösungsmittel für die Substanzen wurde ein isotonischer Phosphatpuffer (nach Hind und Goyan, 1947) mit einem pH-Wert von 7,4 verwendet. Dieser Puffer wurde gewählt, weil er in seinem pH-Bereich und in seinem osmotischen Verhalten weitgehend physiologischen Bedingungen entspricht. Für die Herstellung des Puffers wurden 1,84 g NaH_2PO_4, 9,49 g Na_2HPO_4 und 4,4 g NaCl auf 1000 ml Aqua bidest gelöst. Die Pufferkonzentration war 0,066 molar. Der Zusatz von Kochsalz zum Puffer war notwendig, um die beim Arbeiten mit Membranen und Proteinen sich gewöhnlich einstellenden Donnan-Ungleichgewichte zu unterdrücken.

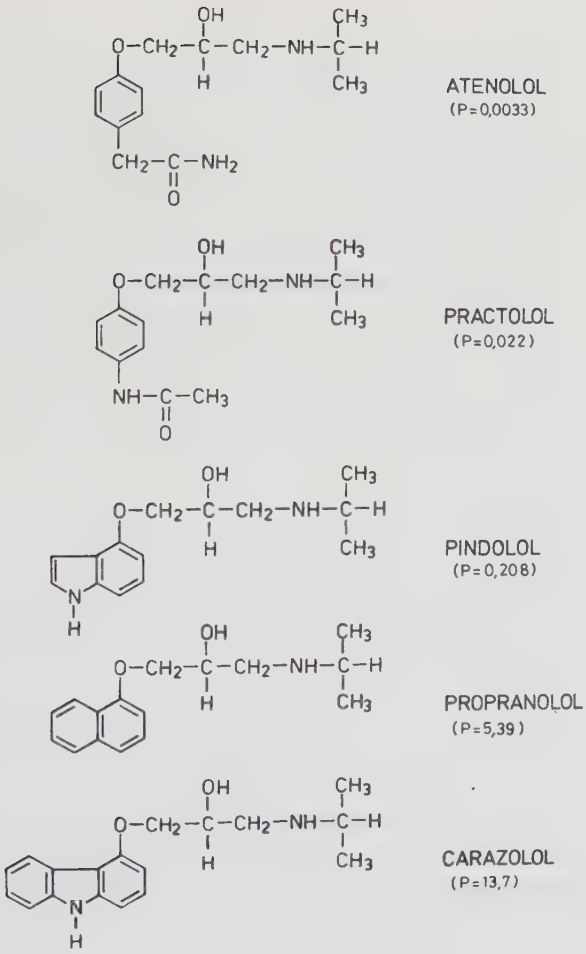

Abbildung 1
Chemische Strukturformeln der untersuchten ß-Rezeptorenblocker, angeordnet nach steigender Lipophilie in Form ihrer Octanol/Puffer-Verteilungskoeffizienten (P).

2.2. Dialysiergerät

Dialysiert wurde mit dem DIANORM-Gleichgewichts-Dialyse-System (Weder und Bickel, 1970, Weder et al. 1971, Schildknecht und Weder, 1971), das aus Dialysierkolonnen mit jeweils 5 Dialysierzellen besteht. Jede Dialysierzelle setzt sich aus zwei von außen zugänglichen Teflonhalbzellen mit jeweils 1 ml Fassungsvermögen zusammen, zwischen die eine Membran als semipermeable Trennwand eingespannt wird. Durch das Material Teflon (DTFE) wird praktisch jede Absorption der eingesetzten Substanzen verhindert (Minder et al., 1970).

Die Zellkolonnen konnten über einen Motor mit variabler Geschwindigkeit in Rotation versetzt werden, und dadurch eine schonende Durchmischung der Lösungen erreicht werden. Für alle Bestimmungen mit den ß-Blockern wurde eine einheitliche Umdrehungsgeschwindigkeit von 10 U/min gewählt, da bei schnellerer Rotation eine Denaturierung der Eiweiße zu erwarten ist (Dianorm -Anleitung). Das System wurde für die Versuche in ein Wasserbad gesetzt, dessen Temperatur $37 \pm 0{,}5^{\circ}C$ betrug, so daß alle Versuche bei einer konstanten Temperatur durchgeführt wurden, die den physiologischen Temperaturbedingungen entspricht, wobei schon nach 10 Minuten ein vollständiger Temperaturausgleich im Dialysegerät erreicht war.

Für die praktische Durchführung wurde in die eine Zellhälfte (Halbzelle 1) 1,00 ml der pharmakonfreien, hoch molekularen Verbindung (z.B. Albuminlösung oder Vollblut) mit einer geeichten Glasspitze pipettiert, und in die andere Zellhälfte (Halbzelle 2) 1,00 ml der Puffer-Lösung,

die das Pharmakon enthielt. Dabei waren in allen Versuchen pH-Wert und Ionenstärke dieser beiden Lösungen konstant. Durch die Rotation der Zellen, die um eine Achse erfolgte, die senkrecht zur Membran stand, standen die durchmischten Lösungen in dauerndem Kontakt zum Membran. Nach Einstellen des Diffusionsgleichgewichts wurden die Lösungen den jeweiligen Zellhälften entnommen und die verbliebene Konzentration des Pharmakons in der Halbzelle 2 photometrisch bestimmt.

2.3. Membran

Bei der Wahl der Membran standen verschiedene Materialien zur Verfügung (z.B. regenerierte Cellulose, Celluloseacetat, Cellulosenitrat, Polycarbonat oder Polyamid) mit unterschiedlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften (Tabelle 1). Für die im folgenden beschriebenen Versuche mußte die Porengröße der Membran so klein sein, daß ein vollständiges Zurückhalten der Biopolymeren durch die Membran gewährleistet war. Andererseits aber mußte der mittlere Porendurchmesser groß genug sein, daß das Pharmakon frei diffundieren und sich das Diffusionsgleichgewicht rasch einstellen konnte. Außerdem sollte die Absorption von Biopolymeren oder Pharmaka so gering wie möglich gehalten werden.

Es wurde deshalb für alle Versuchsreihen eine Membran aus reinstem Cellulose-Hydrat gewählt (Diachema-Membran für Dialyse und Ultrafiltration, Ref.-Nr. 10.14) mit einer Durchlaßgrenze bei einem Molekulargewicht von ca. 5000 (abhängig von der Struktur und Konformation der Moleküle und von Temperatur- und Druckverhältnissen). Das Molekulargewicht der untersuchten ß-Blocker reichte dabei von 248 bis 298 für die Basen. Die Diffusion durch die Membran erfolgte als Prozeß 1. Ordnung (linear). Die Membrandicke betrug 0,025 mm. Der von Eckert et al. (1973) beobachtete Rückhalteeffekt bei Cellulose-Membranen, d.h. eine Hemmung der freien Diffusion von organischen Basen im pH-Bereich von 6-8, bedingt durch Lösungseigenschaften der Membranfilter für die freien Basen, konnte hier ausgeschlossen werden, da die hier untersuchten ß-Rezeptorenblocker bei pH 7,4 vollständig dissoziert vorlagen, nur ein einziger Membrantyp verwendet wurde, und zudem

die trotzdem auftretende Membranbindung quantifiziert (Punkt 2.6.3.) und so in der rechnerischen Auswertung berücksichtigt wurde.

Um vor den Versuchen die Membran von eventuell austretenden Membranbestandteilen, wie Weichmacher oder anderen Verunreinigungen zu entfernen, die bei den Gleichgewichtsstudien die Analytik des Pharmakons stören könnten, wurden die Membranen vor jeder Verwendung 10 Minuten in destilliertem Wasser und anschließend in dem verwendeten Puffer inkubiert.

Aufbewahrt wurden die Membranen bei 20°C und 50% rel. Luftfeuchtigkeit.

Membran	Hersteller	Dicke (µm)	Porendurchmesserbereich - (Å)	Ausschlußgrenze[+] (Mol.-Gew.)
Regenerierte Cellulose	Sartorius	80-110	< 50-350	20'000 bis 160'000
Regenerierte Cellulose (Visking Dialysierschlauch)	Union Carbide	25	15-20	12'000
Regenerierte Cellulose	J.P. Bemberg	10	50	20'000
Regenerierte Cellulose ("Spectrapor")	Spectrum Medical Industries Inc.	20	[++]	Typ 1: 6'000 Typ 2: 12'000 Typ 3: 3'000
Celluloseacetat	Sartorius	80-110	< 50-350	20'000 bis 160'000
Celluloseacetat	Oxoid	120	5'000	> 1 Mio.
Polycarbonat (Nuclepore)	General Electric	5-10	300-80'000	> 150'000 bis einige Mio.
Polyamid	Sartorius	200	6'000-80'000	> 1 Mio. bis einige Mio.

[+]) Angaben über Molekulargewichtsausschlußgrenzen: Moleküle mit höherem Molekulargewicht als die in Tabelle 2 angegebenen, werden von diesen Membranen zurückgehalten.

[++]) Keine Angaben erhältlich.

Tabelle 1

Membranen und ihre wichtigsten Eigenschaften für die Gleichgewichtsdialyse (zusammengestellt nach Angaben ihrer Hersteller).

(nach:Dianorm-Arbeitsanleitung für Bindungsstudien)

2.4. Versuchsbedingungen

Bei der Gleichgewichtsdialyse wird eine hochmolekulare Verbindung durch eine semipermeable Membran von der niedermolekularen Verbindung, dem Liganden, getrennt. Während der Dialyse kommt es zu einem Durchtritt des freien Liganden durch die Membran, der durch das 1. Fick'sche Diffusionsgesetz bestimmt wird. Aus dieser Beziehung ergibt sich, daß die Einstellung des Diffusionsgleichgewichtes von der Membranfläche, dem Konzentrationsgradienten und dem Diffusionskoeffizienten abhängig ist, wobei dieser eine Funktion der Temperatur und der Art des Liganden ist.

Da der Diffusionskoeffizient direkt proportional der Temperatur ist, wurden sämtliche Versuche im Wasserbad bei einer Temperatur von 37 $\pm$ 0,5°C durchgeführt. Nach Daniel (1950) nimmt die Diffusionsgeschwindigkeit für relativ kleine Liganden um ca. 2% pro Grad Celsius zu. Ob auch die Höhe der Proteinbindung von der Temperatur abhängig ist, wird kontrovers diskutiert: So fanden Appelgren et al. (1974) keine Temperaturabhängigkeit bei der Proteinbindung von Propranolol, während Scholtan (1964) eine deutliche Temperaturabhängigkeit für die Proteinbindung von Sulfonamiden, und Niedner et al. (1975) für Phenprocoumaon fanden. Andererseits konnten Woods und Robinson (1981) zeigen, daß bereits die Bindung von ß-Rezeptorenblocker an n-Octanol temperaturabhängig ist: Bei der Bestimmung der Verteilungskoeffizienten von 10 ß-Rezeptorenblocker fanden sie eine Zunahme der Verteilungskoeffizienten um mehr als das Doppelte, wenn die Temperatur von 20°C auf 37°C erhöht wurde.

Das Füllvolumen in der Dialysierzelle geht insofern in die Fick'sche Gleichung ein, als sich die Diffusionsfläche relativ ändert. Mit zunehmendem Füllvolumen wird die Membranfläche relativ kleiner und damit die Dialysierzeit länger (Weder et al., 1971). Die Halbzellen wurden deshalb immer mit einem Flüssigkeitsvolumen von 1,00 ml gefüllt.

pH-Wert und Ionenstärke haben einen großen Einfluß auf die Bindung der ß-Rezeptorenblocker an Proteine (Weder et al., 1971, Appelgren et al., 1974, Henry und Mitchell, 1980, Henry et al., 1981), möglicherweise weil die ß-Rezeptorenblocker schwache Basen sind, bzw. als Salze vorliegen, und eine Änderung des pH-Wertes zu einer Veränderung der Ionisation (Appelgren et al., 1974) und damit der Bindung führen kann. Sogar im physiologischen pH-Bereich von pH 7,3 bis 7,5 kann die Schwankung der Proteinbindung eines Arzneimittels beträchtlich sein (Krieglstein, 1969). Als Lösungsmittel für alle Untersuchungen wurde deshalb immer der unter 2.1. beschriebene isotonische Phosphatpuffer nach Hind und Goyan (1947) mit einem pH-Wert von 7,4 verwendet und die Kostanz des pH-Wertes regelmäßig mit einer Wasserstoffionen-spezifischen Glaselektrode (Knick pH-mV-Meter Typ 710) überprüft.

Um weitere Einflüsse auf die Gleichgewichts-Dialyse und die Analytik zu erfassen, war es nötig, vor Durchführung der Bindungsstudien die unter 2.6. beschriebenen Voruntersuchungen durchzuführen.

2.5. Analytische Bestimmung der ß-Rezeptorenblocker

Für die photometrische Bestimmung der ß-Rezeptorenblocker wurde ein Zeiss-Photometer Typ PMQ II mit einem Prismenmonochromator Typ M4 QIII verwendet. Die Spaltbreite des Monochromators betrug bei allen Messungen 0,4 fix x 10, als Vorsatz wurde ein MT 4 - Filter verwendet. Verstärkt wurde max mal mit Stufe II.

Die Lösungen wurden in Quarz-Küvetten mit der Schichtdicke d = 0,5 cm bestimmt. Die erhaltenen Extinktionswerte wurden zur späteren Berechnung verdoppelt, sodaß die rechnerische Schichtdicke d = 1,0 cm betrug.

Die einzelnen ß-Rezeptorenblocker wurden bei der Wellenlänge ihrer (vorher bestimmten) maximalen Extinktion bestimmt. Diese lagen bei:

Atenolol: λ = 274 nm
Practolol: λ = 244 nm
Pindolol: λ = 263 nm
Propranolol: λ = 290 nm
Carazolol: λ = 284,5 nm

Um festzustellen, ob die vier verwendeten Quarz-Küvetten möglicherweise eine unterschiedliche Transmission besitzen, wurden sie bei den entsprechenden Wellenlängen miteinander verglichen. Die gefundenen Unterschiede in der Transmission (Tabelle 2) waren vernachläßigbar klein und fanden keine weitere Berücksichtigung.

	λ = 290 nm		λ = 284,5 nm		λ = 274 nm		λ = 263 nm		λ = 244 nm	
Küvette	E	T[%]	E	T[%]	E	T[%]	E	T[%]	E	T[%]
1	0.006	98.6	0.006	98.7	0.006	98.6	0.006	98.6	0.006	98.7
2	-0.007	101.6	-0.008	101.8	-0.009	102.0	-0.009	102.0	-0.011	102.6
3	-0.003	100.7	-0.004	100.9	-0.004	100.9	-0.004	100.9	-0.005	101.4
4	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100
$\bar{x}$ =	-0.001	100.225	-0.002	100.35	-0.002	100.375	-0.002	100.375	-0.003	-100.675

Tabelle 2

Bestimmung der unterschiedlichen Extinktion E , bzw. Transmission T der verwendeten Küvetten zur Photometrie, bei unterschiedlichen Wellenlängen. Küvette 4 wurde als Standard definiert. Mit Angabe der Mittelwerte $\bar{x}$.

2.6. Voruntersuchungen

2.6.1. Bestimmung der Konzentrationsabhängigkeit der Extinktion

Grundlage der quantitativen photometrischen Analytik ist das Lambert-Beer'sche Gesetz, das den Zusammenhang zwischen der Konzentration c des zu bestimmenden Stoffes und dem Intensitätsverhältnis I_o/I der Extinktion E angibt:

$$I = I_o \cdot e^{\varepsilon d}$$

$$E = \lg \frac{I_o}{I} = d \cdot c \cdot \varepsilon$$

$$\varepsilon = \frac{E^{1\%}_{1cm} \cdot MG}{10},$$

wobei d [cm] die Schichtdicke der Küvette, MG das Molekulargewicht, c [Mol/l] die Konzentration, ε der molare Extinktionskoeffizient der zu untersuchenden Substanz - und damit eine Stoffkonstante -, I_o die Intensität der monochromatischen Strahlung durch die Küvette mit dem Lösungsmittel (Puffer) und I die Strahlungsintensität in der mit Pharmakonlösung beschickten Küvette ist.

Im Regelfall verhalten sich Extinktion und Konzentration proportional zueinander. Die daraus resultierende lineare Beziehung kann deshalb als Eichgerade verwendet werden. Da die ß-Rezeptorenblocker im gelösten Zustand möglicherweise nicht stabil sind, wurde bei jedem neuen Versuchsdurchgang ein neuer Lösungsansatz hergestellt und die Erfüllung des Lambert-Beer'schen Gesetzes durch das Erstellen einer neuen Eichgeraden überprüft.

2.6.2. Bestimmung der Dialysierzeit

Es wurde die Zeit bestimmt, in der im Dialysesystem ein Konzentrationsgleichgewicht zwischen den beiden Halbzellen erreicht worden war, um so eine Zeitdauer für alle späteren Dialysierversuche definieren zu können.

Die Substanzen wurden dafür jeweils in einer Konzentration von $5 \cdot 10^{-5}$ Mol/l in einer Dialysierkolonne (je 5 Zellen) gegen Puffer dialysiert und nach 15, 30, 60, 105 und 180 Minuten die Konzentration der Substanzen in beiden Zellhälften bestimmt. Alle Versuche wurden wiederholt.

Wie die Abbildung 2 zeigt, war das Diffusionsgleichgewicht bei Atenolol, Pindolol, Practolol und Carazolol nach 105 min erreicht, bei Propranolol und seinen Enantiomeren bereits nach 60 min. Die Tatsache, daß die nach erfolgter Dialyse in beiden Halbzellen gemessene Konzentration zum Teil unter der zu erwartenden Konzentration von $2{,}5 \cdot 10^{-5}$ Mol/l pro Halbzelle lag, erklärt sich aus der unterschiedlichen Bindung der untersuchten ß-Rezeptorenblocker an die Membran (siehe 2.6.3.).

Die Dialysierzeit wurde nach diesen Vorversuchen für alle weiteren Untersuchungen und für alle Substanzen auf 180 min festgelegt. Die Konzentration der untersuchten Substanzen hat keinen Einfluß auf die Dialysierzeit, da die Diffusionsgeschwindigkeit mit dem Konzentrationsgefälle gleichermaßen ansteigt, wie die Konzentration selbst (Schildknecht und Weder, 1971).

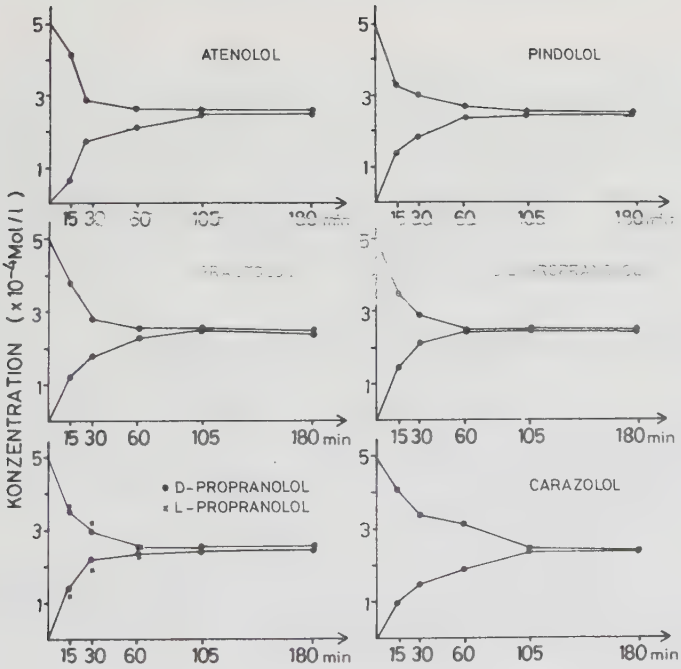

Abbildung 2
Bestimmung der Dialysierzeit bei einer Pharmakonkonzentration von $5 \cdot 10^{-4}$ Mol/l. Dialysiert wurde gegen Puffer. Entnahmezeiten nach 15, 30, 60, 105 und 180 Minuten. Die Punkte sind Mittelwerte aus zwei voneinander unabhängigen Versuchen. Versuchsdurchführung nach 2.6.2.

2.6.3. Bestimmung der Membranbindung

Wie unter 2.3. ausgeführt, haben Biopolymer-Membranen die Eigenschaften, Pharmaka zu adsorbieren, und damit dem System in der Gleichgewichtsdialyse zu entziehen. Um diesen unvermeidlichen methodischen Fehler zu quantifizieren, wurde der Anteil der eingesetzten dialysierten Substanz bestimmt, der sich während der Dialyse an die Dialysiermembran gebunden hatte.

Alle Substanzen wurden bei einer Konzentration von $5 \cdot 10^{-4}$ Mol/ltr. hinsichtlich ihrer Membranbindung untersucht. Dabei wurde in jeweils 10 Zellen die Substanz - in Puffer gelöst - in beide Halbzellen gegeben und dialysiert. Nach drei Stunden wurde die verbliebene Konzentration in den Halbzellen gemessen.

Bei den späteren Berechnungen der Bindung (siehe unter 2.8.) wurde jeweils der so bestimmte Anteil der Membranbindung entsprechend berücksichtigt.

2.6.4. Bestimmung der Konzentrationsabhängigkeit der Membranbindung

Da die unter 2.6.3. beschriebene Bestimmung der Membranbindung nur bei einer konstanten Konzentration von $5 \cdot 10^{-4}$ Mol/ltr. durchgeführt wurde, es andererseits aber nicht auszuschließen ist, daß die Bindung an die Membran, relativ gesehen, konzentrationsabhängig ist, wurde die Membranbindung in einem Konzentrationsbereich von $5 \cdot 10^{-5}$ bis $5 \cdot 10^{-3}$ Mol/ltr. (Carazolol: $5 \cdot 10^{-5}$ bis $1 \cdot 10^{-3}$ Mol/ltr.) erneut bestimmt.

2.6.5. Bestimmung von Membranbestandteilen

Es wurde untersucht, ob während der Dialyse von der Membran Stoffe abgegeben werden (Weichmacher, Verunreinigungen, etc.), die bei der betreffenden Wellenlänge in der photometrischen Analytik eine Eigenabsorption haben und somit die Versuchsergebnisse verfälschen können. Puffer wurde dazu gegen Puffer 180 Minuten lang dialysiert und die Lösung gegen nicht dialysierten Puffer photometrisch bestimmt.

Es zeigte sich, daß für die Pufferlösung in jeder Zellhälfte im Mittel eine Extinktion von 0,088 gefunden wurde, was beispielsweise bei einer Wellenlänge von λ = 274 nm (der maximalen Extinktion von Atenolol) theoretisch (nach dem Lambert-Beerschen Gesetz) einer Konzentration von $1{,}3 \cdot 10^{-4}$ Mol/l Atenolol entsprechen würde.

Es werden also von der Membran Bestandteile abgegeben, die durch vorherige Inkubation der Membran nicht entfernt werden konnten. Da angenommen werden kann, daß die Abgabe dieser Stoffe im wesentlichen konstant ist, wurde im folgenden bei allen Untersuchungen immer eine nur mit Puffer gefüllte Zelle (Halbzelle 1: Albumin-Lsg., Plasma oder Vollbut; Halbzelle 2: Puffer) mit in die Bestimmung einbezogen und als "Leerwert" für die photometrische Analytik der betreffenden Bindungsuntersuchung verwendet.

2.6.6. Bestimmung des Albuminübertritts

Da auch die bei den hier vorliegenden Untersuchungen verwendeten hochgereinigten Albuminpräparationen Eiweißfraktionen niedrigeren Molekulargewichts enthalten können, bzw. nicht auszuschließen ist, daß solche infolge der Versuchsbedingungen entstehen können, wurde der Anteil an Albumin bestimmt, der bei der Dialyse in die eiweißfreie Zellhälfte durch die Membran diffundiert und somit eine Eigenextinktion E in der später zu messenden Lösung hervorruft.

Zur Bestimmung dieses "Albuminfehlers" wurden in einem Versuch zehnmal eine 4,2%ige Albuminlösung (siehe 2.7.1.) gegen Puffer dialysiert und diese Pufferlösung photometrisch gegen nicht dialysierten Puffer bei verschiedenen Wellenlängen bestimmt:

λ = 290 nm	(Propranolol)	E = 0,028	SEM = $\pm$ 0,002
λ = 284,5 nm	(Carazolol)	E = 0,033	SEM = $\pm$ 0,002
λ = 274 nm	(Pindolol)	E = 0,041	SEM = $\pm$ 0,003
λ = 263 nm	(Practolol, Pindolol)	E = 0,055	SEM = $\pm$ 0,003

(E ist der Mittelwert der Extinktionen aus 10 Bestimmungen in einem Versuch (n = 10) $\pm$ SEM)

Die Extinktionswerte dieses "Albuminfehlers" wurden bei den entsprechenden Versuchsmessungen jeweils vom Versuchsextinktionswert abgezogen, es sei denn, bei dem entsprechenden Versuch lief eine pharmakonfreie Zelle als Leerwert mit, die für die übrigen Messungen als Nullwert diente.

2.6.7. Bestimmung des Plasmaproteinübertritts

Die unter 2.6.6. dargestellten Bestimmungen wurden auch für Blutplasma durchgeführt und der übergetretene Plasmaproteinanteil als "Plasmafehler" bezeichnet.

Dazu wurde Plasma gegen Puffer dialysiert und die Extinktion E des Puffers mit dem darin enthaltenen Plasmaanteil bestimmt. Es ergaben sich folgende "Plasmaproteinfehler":

λ = 290 nm	(Propranolol)	E = 0,866	SEM = $\pm$ 0,007
λ = 284,5 nm	(Carazolol)	E = 0,806	SEM = $\pm$ 0,007
λ = 274 nm	(Atenolol)	E = 0,551	SEM = $\pm$ 0,007
λ = 244 nm	(Practolol, Pindolol)	E = 0,739	SEM = $\pm$ 0,010

(Es ist der Mittelwert der Extinktionen aus 4 Bestimmungen in einem Versuch (n = 4) $\pm$ SEM)

Auch hier gilt, daß in den Fällen, wo die Versuchsergebnisse nicht gegen einen mitlaufenden Leerwert gemessen wurden, der entsprechende oben angegebene "Plasmafehler" vom Extinktionswert abgezogen wurde.

2.6.8. Bestimmung des Vollblutübertritts

Die unter 2.6.6. dargestellten Bestimmungen wurden entsprechend für Vollblut durchgeführt und der übertretende Vollblutanteil als "Vollblutfehler" bezeichnet:

Es ergaben sich folgende "Vollblutfehler":

λ = 290 nm	(Propranolol)	E = 1,108	SEM = $\pm$ 0,037
λ = 284,5 nm	(Carazolol)	E = 0,980	SEM = $\pm$ 0,036
λ = 274 nm	(Atenolol)	E = 0,885	SEM = $\pm$ 0,022
λ = 244 nm	(Practolol, Pindolol)	E = 0,990	SEM = $\pm$ 0,031

(Es ist der Mittelwert der Extinktionen aus 5 Bestimmungen in einem Versuch (n = 5) $\pm$ SEM)

Der entsprechende "Vollblutfehler" wurde bei den Bindungsuntersuchungen von der Extinktion abgezogen, wenn nicht gegen einen Leerwert photometrisch als Nullwert gemessen wurde.

2.7. Bindungsstudien

Die nach diesen Voruntersuchungen (Teil 2.6.) durchgeführten Bindungsstudien betrafen die Bindung der verschiedenen ß-Rezeptorenblocker an Humanserumalbumin, Plasmaproteine und Vollblut.

2.7.1. Bestimmung der Albuminbindung

Es wurden diejenigen Stoffanteile bestimmt, die nach der unter 2.6.2. ermittelten Dialysierzeit in Abhängigkeit von der Konzentration des Liganden an Humanalbumin gebunden wurde.

Verwendet wurde hierfür Humanserumalbumin - Behring (trocken, reinst, Art.-Nr. R 9230, elektrophoretischer Reinheitsgrad 100%, Batch - Nr. 4965E, das vorschriftsmäßig bei + 4°C gelagert wurde). Das Albumin wurde für die Untersuchungen zu 4,2% in isotonischem Phosphat-Puffer gelöst (entsprechend $6{,}5 \times 10^{-4}$ Mol/l).

Diese Konzentration wurde gewählt, weil sie den physiologischen Gegebenheiten entspricht, denn eine Veränderung der Albuminkonzentration hat eine deutliche Veränderung der Bindung von ß-Rezeptorenblockern zur Folge (Appelgren et al., 1974). Appelgren fand zudem eine unterschiedliche Bindung zwischen verschiedenen Chargen des HSA, weswegen hier nur Albumin derselben Charge verwendet wurde.

2.7.2. Bestimmung der Plasmabindung

Es wurde der Stoffanteil bestimmt, der nach der unter 2.6.2. ermittelten Dialysierzeit in Abhängigkeit von der Konzentration des Liganden an Plasmaproteine gebunden wird.

Für diese Untersuchungen wurde Plasma verwendet, das aus dem Vollblut des Untersuchers gewonnen wurde. Dazu wurde das entnommene Blut mit einer geringen Menge Heparin versetzt und 20 min stehen gelassen. Anschließend wurde 30 min bei 5000 U/min zentrifugiert, der Überstand dekantiert, mit einer Spritze vorischtig aufgezogen, und in Glasgefäßen bei - 20°C bis zum Verbrauch aufbewahrt.

Eine Elektrophorese des Plasmas ergab Werte für die Proteinfraktion, die alle im Normbereich lagen (siehe Abbildung 3).

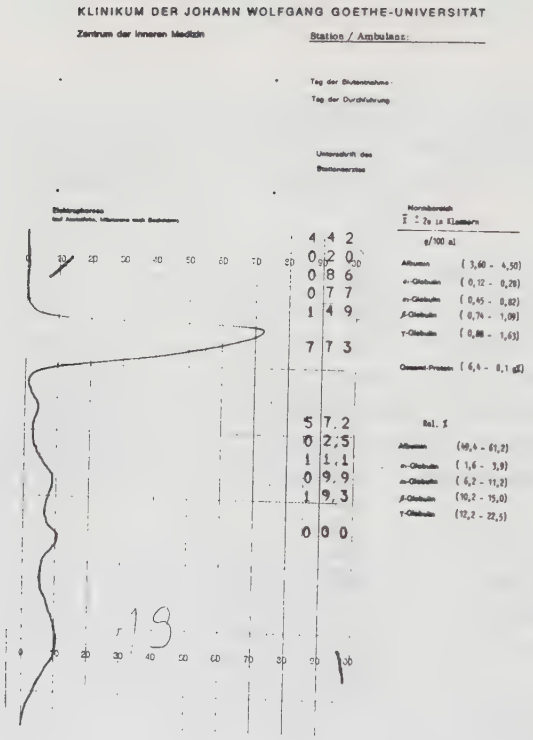

Abbildung 3
Elektrophorese des in den Untersuchungen verwendeten Blutplasmas.

2.7.3. Bestimmung der Vollblutbindung

Es wurden die Stoffanteile bestimmt, die nach Beendigung der Gleichgewichtsdialyse in Abhängigkeit von ihrer Konzentration an heparinisiertes Vollblut gebunden wurden.

Viele Autoren verzichten auf die Untersuchung der Bindung an Vollblut, da - wie Nieder et al. (1975) kritisierten - zu viele die Bindung in nicht kontrollierbarer Weise beeinflussende Parameter in die Untersuchung eingehen: je nach Spender wechselnder Gehalt an Albumin, Globulin, Bilirubin u.ä. Als technisch einfacheres Modell wird daher gelegentlich eine Suspension herangezogen, die lediglich aus gewaschenen Erythrozyten und Serumalbumin besteht. Dieses Problem wurde hier in der Untersuchung dadurch umgangen, daß alle Vollblutproben aus der gleichen Entnahmemenge von ein und demselben Spender stammten. Auch das Plasma der unter 2.7.2. beschriebenen Versuche stammte aus dieser Entnahme.

Diese Untersuchungen konnten nicht für d-Propranolol und l-Propranolol durchgeführt werden, da für die letzten beiden Untersuchungen kein Vollblut mehr zur Verfügung stand.

Da Cruze und Meyer (1976) bei der Arbeit mit der Gleichgewichtsdialyse eine Hämolyse der roten Blutzellen für ungewöhnliche Bindungswerte verantwortlich machten, wurde überprüft, ob es auch bei den hier gewählten Versuchsbedingungen zu einer Hämolyse kommen kann. Alle Untersuchungen, auch bei schnellerer Rotation der Zellen (bis

30 U/min) ergaben, daß die Versuchsbedingungen zu keiner Hämolyse im dialysierten Blut führten. Zudem sind die ß-Rezeptorenblocker membranstabilisierende Substanzen (Lemmer et al., 1972, Wiethold et al., 1973, Olaison und Øye, 1973), so daß zu erwarten ist, daß bei den Bindungsuntersuchungen die ß-Rezeptorenblocker selber zu einem Schutz vor Hämolyse beitragen.

2.8. Rechnerische Auswertung

Für die Berechnung des gebundenen Anteils der ß-Rezeptorenblocker an Eiweißkörper wurde davon ausgegangen, daß sich bei allen Untersuchungen nach jeweils drei Stunden ein Gleichgewicht eingestellt hat, einerseits zwischen dem gebundenen Liganden und dem freien Liganden, und andererseits zwischen den freien Liganden in beiden Zellhälften, da diese ungehindert durch die Membran diffundieren können. Die Konzentration der freien Liganden in beiden Zellhälften ist deshalb am Ende der Dialyse gleich groß. Die eingesetzte Ligandenkonzentration wurde zur rechnerischen Auswertung noch um den an die Membran gebundenen prozentualen Anteil (Membranbindung) korrigiert (= C_o).

Die Berechnung der Bindung ergibt sich dann nach folgender Gleichung:

$$f = \frac{(C_o - C_{BU}) - C_{BU}}{C_o - C_{BU}} \cdot 100 \; [\%]$$

wobei f der gebundene Anteil des ß-Rezeptorenblockers in Prozent der eingesetzten Konzentration ist und C_{BU} die Konzentration des Liganden im Puffer, d.h. der nicht gebundene Anteil.

2.9. Bestimmung der Verteilungskoeffizienten

Die Ermittlung der Verteilungskoeffizienten P der ß-Rezeptorenblocker zwischen n-Octanol und isotonischem Phosphat-Puffer erfolgte im wesentlichen nach den Vorschriften von Leo et al. (1971) sowie von Church und Hansch (unveröffentlicht). Da auch untersucht werden sollte, ob die Verteilungskoeffizienten von der Konzentration der Pharmakonlösung abhängig sind, wurden Lösungen der ß-Rezeptorenblocker mit einer Konzentration von 0,5, 1, 5, 10 und 50 · 10^{-4} Mol/l hergestellt. Als Lösungsmittel diente dabei isotonischer NaCl-Phosphat-Puffer, der vorher mit n-Octanol gesättigt wurde, und der einen pH von 7,0 bzw. 7,4 hatte. Zur Herstellung des Puffers mit pH 7,0 wurden 3,643 g $NaH_2PO_4 \cdot 1\ H_2O$, 7,048 g $Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$ und 0,44 g NaCL in 100 ml Aqua bidest gelöst. Die Herstellung des Puffers mit pH 7,4 ist unter Punkt 2.1 beschrieben.

Von diesen Verdünnungen wurden jeweils 25 ml mit 5 ml n-Octanol verteilt. Von allen Konzentrationen wurden jeweils zwei Untersuchungen jeweils bei pH 7,0 und 7,4 durchgeführt. Als Gefäße dienten konische 100-ml-Extraktionsgläser mit Schliffstopfen in üblicher Laborglasqualität. Diese waren vor Gebrauch zusätzlich zur üblichen Reinigung mit 0,1 N HCl und bidestilliertem Wasser gespült worden, da die Bindung von Pharmaka an Glas zum Teil ganz beträchtlich sein kann, wie Cotham und Shand (1975) am Beispiel von Propranolol aufzeigten.

Die Lösungen wurden in den Gefäßen 30 min in einer Schüttelmaschine (Fa. Desaga, Heidelberg) geschüttelt, an-

schließend 20 min mit ca. 2000 U/min zentrifugiert (Labor-Zentrifuge Typ UJ 3 S, Fa. Christ, Osterode) und über Nacht stehen gelassen. Die verbliebene Pharmaka-Konzentration wurde photometrisch aus der wässrigen Phase gegen Octanol-gesättigten Phosphat-Puffer bestimmt. Die gesamte Versuchsdurchführung erfolgte bei Zimmertemperatur (20°C).

Die Berechnung der Verteilungskoeffizienten erfolgte direkt mit den photometrisch erhaltenen Extinktionswerten:

$$\frac{E_A - E_P}{E_P} = \frac{E_o}{E_P} \qquad (1)$$

hierbei ist E_A die Extinktion der Pharmakonlösung vor der Verteilung und E_P die Extinktion der im Puffer verbliebenen Pharmakonkonzentration nach der Verteilung. E_o ist somit die rechnersich ermittelte ($E_A - E_P$) Extinktion des Pharmakons in der Octanol-Phase. Unter Berücksichtigung des Octanol-Puffer-Verhältnisses v - da 5 ml Puffer gegen die 5-fache Menge Octanol verteilt wurde - kann direkt der Verteilungskoeffizient P berechnet werden:

$$P = \frac{E_o}{E_P \cdot v} \qquad (2)$$

Auf diese Weise wurden die Verteilungskoeffizienten für Propranolol und Pindolol ermittelt.

Die Bestimmung der Verteilungskoeffizienten für Atenolol, Practolol und Pindolol konnte auf Grund der durch die

photometrische Analytik vorgegebenen Erfassungsgrenzen nicht durchgeführt werden: Atenolol und Practolol als sehr hydrophile und Carazolol als sehr lipophiler ß-Rezeptorenblocker hätten,um in bestimmbaren Größen einen Phasenwechsel vorzunehmen bzw. um nach der Verteilung in der wässrigen Phase überhaupt noch photometrisch erfaßbar zu sein, in Größenmengen mit Octanol verteilt werden müssen, die außerhalb der technischen Möglichkeiten in dieser Untersuchung gelegen hätten. Auf ihre Bestimmung wurde deshalb verzichtet und auf Werte in der Literatur zurückgegriffen.

2.10. Die verwendeten Substanzen

Die Pharmaka (siehe Abbildung 1) Atenolol (ICI 66.082) [4-(2-Hydroxy-3-isopropylamino-propoxy) phenyl-acetamid], Practolol (ICI 58.291) [4-(2-Hydroxy-3-isopropylamino-propoxy)-acetanilid], Propranolol [1-(2-Hydroxy-3-isopropylamino-propoxy)-naphthalin, als Hydrochlorid] und seine Enantiomere wurden freundlicherweise von der Firma ICI-Rhein Pharma, Plankstadt, die Substanzen Carazolol (BM 51.052) [4-(2-Hydroxy-3-isopropylamino-propoxy)-carbazol] von der Firma Boehringer, Mannheim, und Pindolol [4-(2-Hydroxy-3-isopropylamino-propoxy)-indol] von der Firma Sandoz, Nürnberg, zur Verfügung gestellt.

Die ß-Rezeptorenblocker Atenolol, Practolol, Indolol und Carazolol lagen als Basen vor und mußten zur Erreichung einer Löslichkeit in Wasser (bzw. Puffer) erst durch Zugabe von zwei Tropfen 0,1-N-HCl in ihr Salz überführt werden. Die Kapazität des Puffers wurde dadurch nicht überschritten.

Alle übrigen Substanzen wurden von der Firma Merck, Darmstadt bezogen (Reinheitsgrad pro analysi):

NaCl
0,1 N HCl
Na_2HPO_4
NaH_2PO_4
n-Octanol

2.11. Statistische Auswertungen

In den graphischen Darstellungen und in den Tabellen sind, so nichts anderes angegeben ist, die Mittelwerte ($\bar{x}$) und der Standard-error-of-mean ($\pm$ SEM) angegeben.

Für die Abbildung 11 wurden die Einzelwerte des Verhältnisses "gebunden/frei" log transformiert und daraus der Mittelwert $\bar{x}$ und $\pm$ SEM ermittelt.

3. Ergebnisse

3.1. Ergebnisse aus den Voruntersuchungen

3.1.1. Bestimmung der Membranbindung

Bei der wie unter 2.6.3. beschriebenen Untersuchung über die Bindung der ß-Rezeptorenblocker an die Cellulose-Hydrat-Membran bewegte sich die ermittelte Membranbindung zwischen 1,98% der eingesetzten Konzentration von $5 \cdot 10^{-4}$ Mol/l bei Atenolol als niedrigstem Wert und 10,98% bei Carazolol als höchstem Wert (Tabelle 3). Damit war die Membranbindung in keinem Fall vernachlässigbar klein und mußte als Verlust aus dem Dialysesystem bei allen Untersuchungen berücksichtigt werden. Die prozentuale Bindung von d- und l-Propanolol entsprach der des Razemates.

Substanz	n	Membranbindung $\bar{x}$ in %	SEM
Atenolol	10	1.98	$\pm$ 0.62
Practolol	10	2.42	$\pm$ 0.59
Pindolol	10	3.04	$\pm$ 0.56
d.l-Propanolol	10	5.118	$\pm$ 0.64
d-Propanolol	10	5.806	$\pm$ 0.31
l-Propranolol	10	4.980	$\pm$ 0.34
Carazolol	10	10.98	$\pm$ 0.51

Tabelle 3

Prozentuale Bindung der ß-Rezeptorenblocker an die Membran. Angaben der Mittelwerte $\pm$ SEM in Prozent der eingesetzten Konzentration von $5 \cdot 10^{-4}$ Mol/l. Versuchsdurchführung nach 2.6.3.

3.1.2. Bestimmung der Konzentrationsabhängigkeit der Membranbindung

Innerhalb eines Konzentrationsbereiches von $3 \cdot 10^{-5}$ bis $5 \cdot 10^{-3}$ Mol/l (Carazolol $3 \cdot 10^{-5}$ bis $1 \cdot 10^{-3}$ Mol/l) zeigte die nach 2.6.4. durchgeführte Bindung der ß-Rezeptorenblocker an die Cellulose-Hydrat-Membran z.T. deutliche Schwankungen um den Mittelwert (Abbildung 4), es konnte jedoch kein signifikanter Trend nachgewiesen werden, der eine Konzentrationsabhängigkeit der Membranbindung aufgezeigt hätte.

Bei allen weiteren Untersuchungen wurden die Werte der Membranbindung berücksichtigt, die in Tabelle 3 angegeben sind.

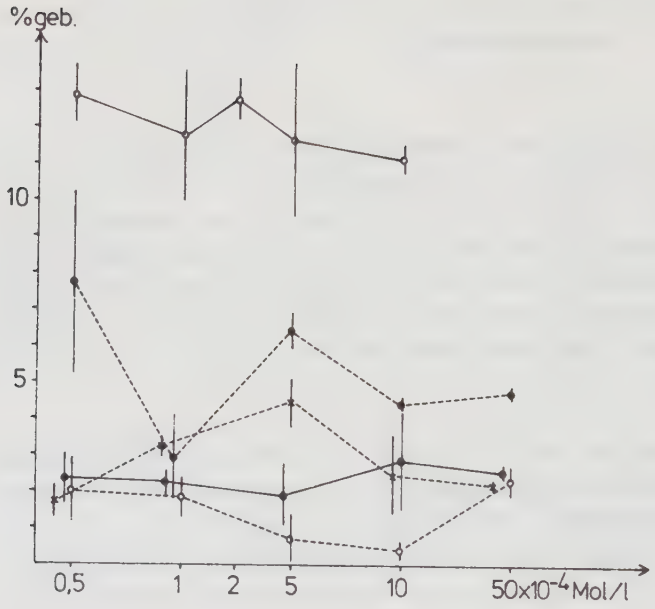

Abbildung 4
Bestimmung der Konzentrationsabhängigkeit der Membranbindung in Prozent der eingesetzten Konzentration.
o---o Atenolol, ●——● Practolol, x---x Pindolol,
●---● Propranolol, o——o Carazolol.
Die Punkte sind Mittelwerte $\pm$ SEM aus fünf gleichzeitig durchgeführten Bestimmungen. Zur besseren Übersicht sind die Punkte teilweise seitlich versetzt wiedergegeben worden. Versuchsdurchführung nach 2.6.4.

3.2. Ergebnisse der Bindungsstudien

3.2.1. Bindung an Humanserumalbumin

Wie unter 2.7.1. beschrieben, wurden die ß-Rezeptorenblocker 180 Minunten lang gegen eine 4,2%ige Humanserumalbumin-Lösung (in isotonischem Phosphat-Puffer) dialysiert. Anschließend wurde die Konzentration des ß-Rezeptorenblockers in der eiweißfreien Halbzelle, und damit die Konzentration des ungebundenen Anteils photometrisch bestimmt und der gebundene Anteil nach 2.8. berechnet. Zuvor wurde zur Korrektur von der Extinktion des freien Liganden der gemittelte Wert des "Albuminfehlers" abgezogen.

Die Ergebnisse der Einzelmessungen der HSA-Bindung der untersuchten ß-Rezeptorenblocker sind in Abbildung 5 wiedergegeben. Die Bindung von Atenolol an Humanalbumin lag - offensichtlich wegen der zu geringen Bindung - im Bereich des Meßfehlers der Bestimmungsmethode.

Demgegenüber zeigten Practolol und Pindolol bereits eine deutliche Bindung an HSA (10-20%), während die Bindung von Propranolol, seinen Enantiomeren und Carazolol, die relativ eng beisammen lagen, relativ hoch war (40-50%). Aus den ermittelten Einzelwerten konnte zumindest in dem hier bestimmten Konzentrationsbereich nicht auf eine Konzentrationsabhängigkeit der Eiweißbindung geschlossen werden. Es handelt sich somit in diesem Konzentrationsbereich nicht um spezifische Bindungsstellen, da sonst mit steigender Konzentration infolge Absättigung der

Bindungsstellen eine relative Abnahme des gebundenen Anteils zu finden sein müßte. Die Einzelwerte wurden deshalb gemittelt und ergaben dann die in Tabelle 4 wiedergegebene Beziehung.

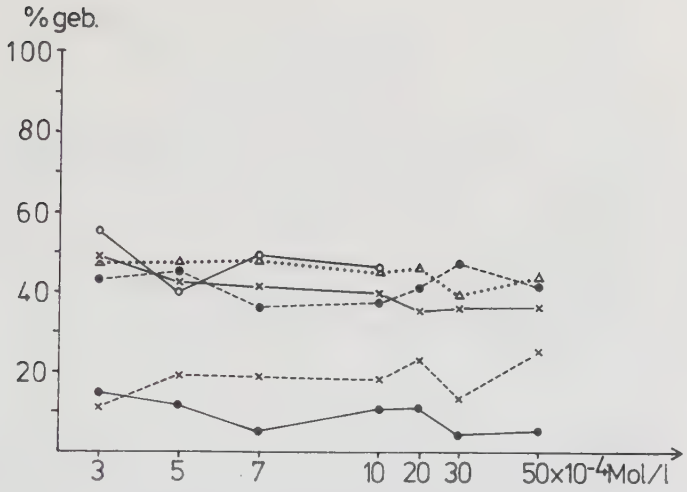

Abbildung 5
Prozentuale Bindung der ß-Rezeptorenblocker an Humanserumalbumin (4,2%), über einen Konzentrationsbereich von $3 \cdot 10^{-4}$ bis $50 \cdot 10^{-4}$ Mol/l (Carazolol bis $10 \cdot 10^{-4}$ Mol/l), mit Ausnahme von Atenolol, das keine meßbare Bindung an HSA aufwies. ●——● Practolol, x---x Pindolol, ●---● d,l-Propranolol, Δ...Δ d-Propranolol, x——x l-Propranolol, o——o Carazolol.
Die Punkte sind die Ergebnisse der in einem Versuch durchgeführten Einzelmessungen.
Versuchsdurchführung nach 2.7.1.

Substanz	n	$\bar{x}$ in %	$\pm$ SEM
Atenolol	nicht bestimmbar		
Practolol	7	9,19	1,56
Pindolol	7	18,53	1,95
d,l-Propranolol	7	42,05	1,47
d-Propranolol	7	45,36	1,17
l-Propranolol	7	40,12	1,73
Carazolol	4	47,56	3,19

Tabelle 4
Bindung der ß-Rezeptorenblocker an Humanserumalbumin (4,2%). Angabe der Mittelwerte $\bar{x} \pm$ SEM (in Prozent) der in einem Versuch durchgeführten Bestimmungen über einen Konzentrationsbereich von $3 \cdot 10^{-4}$ bis $50 \cdot 10^{-4}$ Mol/l (Carazolol $3 \cdot 10^{-4}$ bis $10 \cdot 10^{-4}$ Mol/l). Versuchsbedingungen im Text (2.7.1.).

3.2.2. Bindung an Plasmaproteine

Abbildung 6 zeigt die Ergebnisse der nach 2.7.2. bestimmten Bindung der ß-Rezeptorenblocker an Plasmaproteine. Atenolol konnte erfaßt werden und wurde ähnlich wie Practolol nur gering an Plasma gebunden (bis 10%). Carazolol, Propranolol und seine Enantiomere hatten eine hohe Bindung (60-70%), während die von Pindolol in der Mitte lag (28%). Die Mittelung der Einzelwerte (Tabelle 5) verdeutlicht dies. D,l-Propranolol, d-Propranolol und l-Propranolol zeigten nur sehr geringe Unterschiede in ihrer Bindung, die sicher durch die Bestimmungsmethodik bedingt waren. Auch hier konnte in dem untersuchten Konzentrationsbereich nicht auf eine Konzentrationsabhängigkeit der Bindung geschlossen werden.

Bei der Beurteilung der Plasmabindung ist zu beachten, daß die Bindung an 1,00 ml reines Plasma erfolgte und der Hämatokrit, der bei der Eiweißbindung und der Blutbindung bereits durch die Versuchsmethode berücksichtigt wurde, hier keine Beachtung fand.

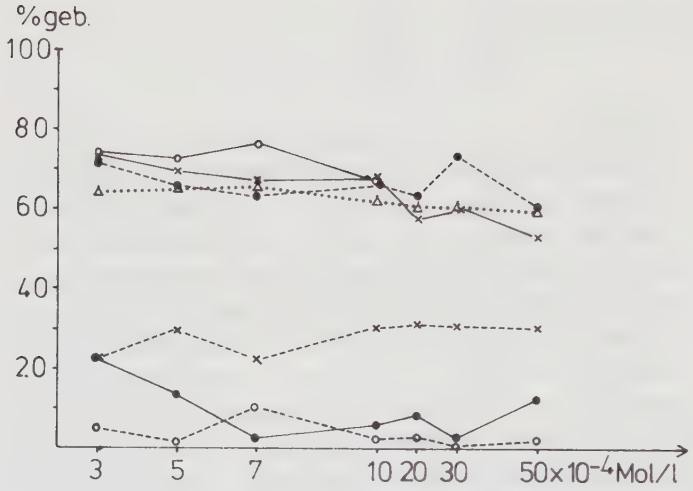

Abbildung 6
Prozentuale Bindung der ß-Rezeptorenblocker an Plasmaproteine über einen Konzentrationsbereich von $3 \cdot 10^{-4}$ bis $50 \cdot 10^{-4}$ Mol/l (Carazolol bis $10 \cdot 10^{-4}$ Mol/l).
o---o Atenolol, ●——● Practolol, x---x Pindolol, ●---● d,l-Propranolol, Δ...Δ d-Propranolol, x——x l-Propranolol, o——o Carazolol.
Die Punkte sind die Ergebnisse der in einem Versuch durchgeführten Einzelmessungen.
Versuchsdurchführung nach 2.7.2.

Substanz	n	$\bar{x}$ in %	$\pm$ SEM
Atenolol	7	3,56	1,26
Practolol	7	9,88	2,66
Pindolol	7	28,05	1,50
d,l-Propranolol	7	66,61	1,79
d-Propranolol	7	62,24	0,91
l-Propranolol	7	64,13	2,76
Carazolol	4	72,23	2,09

Tabelle 5
Bindung der ß-Rezeptorenblocker an Plasmaproteine. Angabe der Mittelwerte $\bar{x} \pm$ SEM (in Prozent) der in einem Versuch durchgeführten Bestimmungen über einen Konzentrationsbereich von $3 \cdot 10^{-4}$ bis $50 \cdot 10^{-4}$ Mol/l (Carazolol $3 \cdot 10^{-4}$ bis $10 \cdot 10^{-4}$ Mol/l). Versuchsbedingungen im Text (2.7.2.).

3.2.3. Bindung an Vollblut

Die Ergebnisse der nach 2.7.3. bestimmten Bindung der ß-Rezeptorenblocker an Blut sind in Abbildung 7 wiedergegeben. Wie beschrieben, konnten die Enantiomere des Propranolols hier nicht untersucht werden. Der bereits bei der Eiweiß-Bindung und der Plasma-Bindung beobachtete Trend war hier ebenfalls ersichtlich: Atenolol wurde niedrig gebunden (11%), Practolol etwas mehr (26%); Carazolol und Propranolol hatten eine hohe Bindung (75-85%), die von Pindolol lag in der Mitte (50%). Die Mittelung der Einzelwerte ist in Tabelle 6 wiedergegeben.

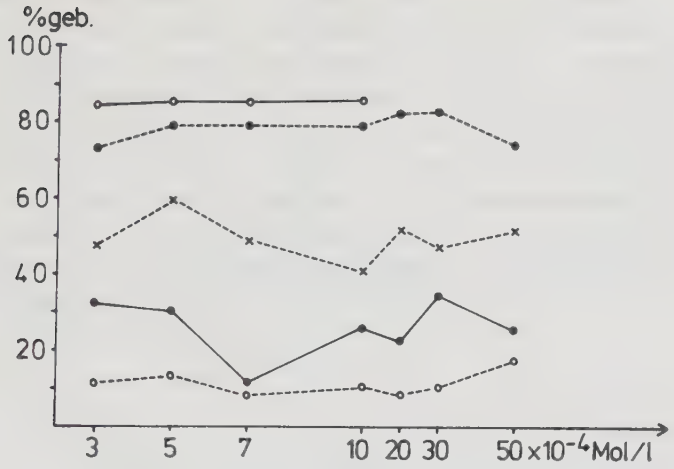

Abbildung 7
Prozentuale Bindung der ß-Rezeptorenblocker an Vollblut über einen Konzentrationsbereich von $3 \cdot 10^{-4}$ bis $50 \cdot 10^{-4}$ Mol/l (Carazolol bis $10 \cdot 10^{-4}$ Mol/l). o---o Atenolol, ●——● Practolol, x---x Pindolol, ●---● d,l-Propranolol, Δ...Δ d-Propranolol, x——x l-Propranolol, o——o Carazolol. Die Punkte sind die Ergebnisse der in einem Versuch durchgeführten Einzelmessungen. Versuchsdurchführung nach 2.7.3.

Substanz	n	$\bar{x}$	$\pm$ SEM
Atenolol	7	11,40	1,13
Practolol	7	26,30	2,85
Pindolol	7	49,62	2,11
d,l-Propranolol	7	78,95	1,40
d.Propranolol	nicht untersucht		
l-Propranolol	nicht untersucht		
Caraczolol	4	85,40	0,33

Tabelle 6

Bindung der ß-Rezeptorenblocker an Vollblut. Angabe der Mittelwerte $\bar{x} \pm$ SEM (in Prozent) der in einem Versuch durchgeführten Bestimmungen über einen Konzentrationsbereich von $3 \cdot 10^{-4}$ bis $50 \cdot 10^{-4}$ Mol/l (Carazolol $3 \cdot 10^{-4}$ bis $10 \cdot 10^{-4}$ Mol/l). d- und l-Propranolol wurden nicht untersucht. Versuchsbedingungen im Text (2.7.3.).

Die in Abbildung 5-7 wiedergegebenen Bindungsverläufe betrachten jeweils zusammengefaßt die HSA-, Plasma- und Blutbindung. Werden die einzelnen Bindungsverläufe für jeweils eine Substanz zusammengefaßt, so ergibt sich das in den Abbildungen 8-10 wiedergegebene Bild. Deutlich zu erkennen sind dann sowohl die Zunahme der Bindung an HSA über Plasma zu Vollblut bei den einzelnen ß-Rezeptorenblockern, als auch die Zunahme der Bindungsverläufe von Atenolol über Practolol und Pindolol zu Propranolol und Carazolol.

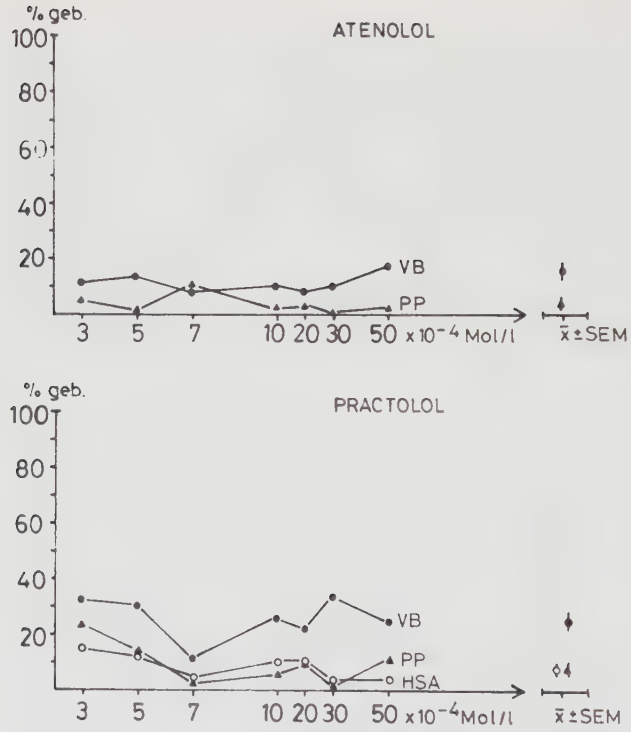

Abbildung 8
Prozentuale Bindung von Atenolol und Practolol an Humanserumalbumin (HSA o——o), Plasmaproteine (PP ▲——▲) und Vollblut (VB ●——●) über einen Konzentrationsbereich von $3 \cdot 10^{-4}$ bis $50 \cdot 10^{-4}$ Mol/l. Dargestellt sind für jedes Kompartiment die Ergebnisse aus einem Dialyseexperiment. Gesondert angegeben sind die Mittelwerte $\bar{x} \pm$ SEM, berechnet aus den Einzelmessungen unabhängig von der Konzentration. Versuchsbedingungen im Text.

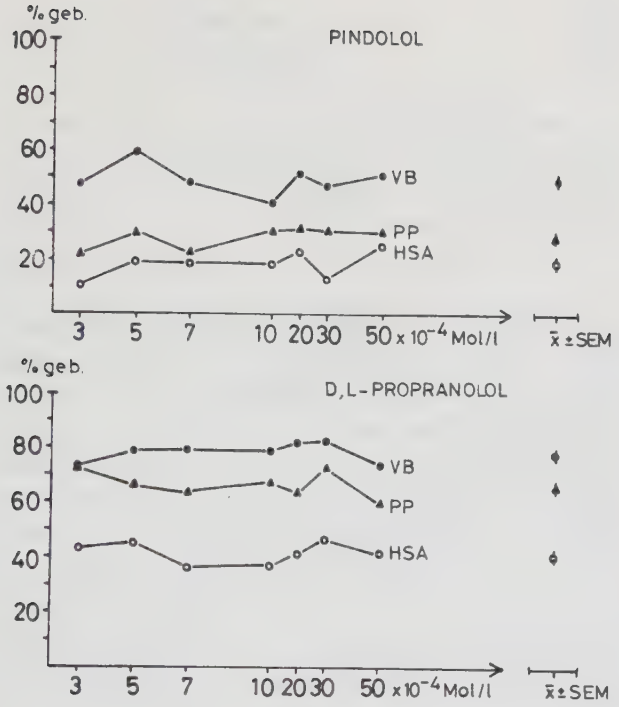

Abbildung 9
Prozentuale Bindung von Pindolol und d,l-Propranolol an Humanserumalbumin (HSA o——o), Plasmaproteine (PP ▲——▲) und Vollblut (VB ●——●) über einen Konzentrationsbereich von $3 \cdot 10^{-4}$ bis $50 \cdot 10^{-4}$ Mol/l. Dargestellt sind für jedes Kompartiment die Ergebnisse aus einem Dialyseexperiment. Gesondert angegeben sind die Mittelwerte $\bar{x} \pm$ SEM, berechnet aus den Einzelmessungen unabhängig von der Konzentration.

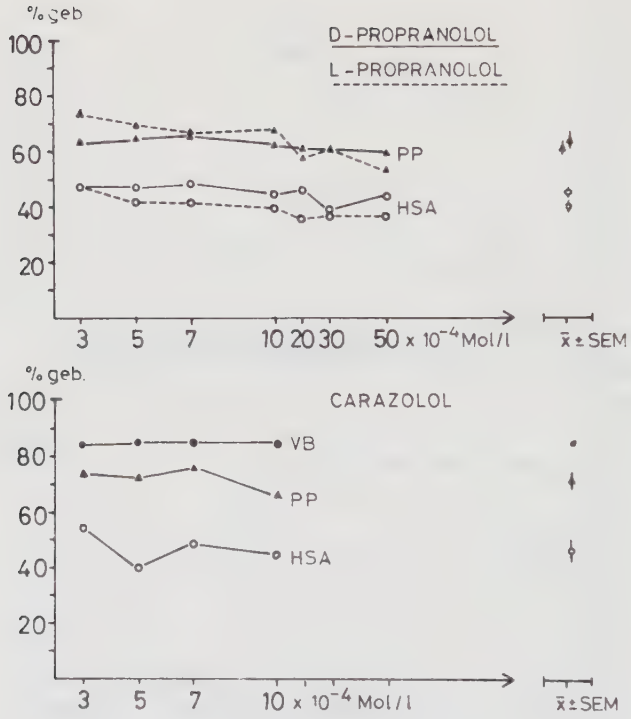

Abbildung 10

Prozentuale Bindung von d- und l-Propranolol und Carazolol an Humanserumalbumin (HSA o——o), Plasmaproteine (PP ▲——▲) und Vollblut (VB ●——●) über einen Konzentrationsbereich von $3 \cdot 10^{-4}$ bis $50 \cdot 10^{-4}$ Mol/l (Carazolol bis $10 \cdot 10^{-4}$ Mol/l). Die Bindung der beiden Propranolol-Enantiomere an Vollblut konnte nicht bestimmt werden. Dargestellt sind für jedes Kompartiment die Ergebnisse aus einem Dialyseexperiment. Gesondert angegeben sind die Mittelwerte $\bar{x} \pm SEM$, berechnet aus den Einzelmessungen unabhängig von der Konzentration. Versuchsbedingungen im Text.

3.3. Berechnete Bindung an Erythrozyten

Nur wenige Studien in der Literatur betreffen die Bindung von ß-Rezeptorenblocker an Erythrozyten. Dabei wird entweder die Bindung an Erythrozyten-Schatten untersucht (Lemmer et al., 1972), oder mit gewaschenen Erythrozyten gearbeitet (Sager und Jacobsen, 1979).

Eine weitere Methode der Bestimmung der Bindung der ß-Rezeptorenblocker an Erythrozyten ist die rechnerische Ermittlung aus den Bindungsdaten für die Vollblutbindung und die Plasmabindung unter Berücksichtigung des Hämatokritwertes. Nach Kurata und Wilkinson (1974) errechnet sich in Bindungsstudien (hier für Diphenylhydantoin) das Verhältnis Blutbindung zu Plasmabindung nach folgender Gleichung:

$$\frac{C_B}{C_P} = \frac{C_{RBC}}{C_P} \; H + (1-H) \qquad (1)$$

C_B ist die in Mol/l ausgedrückte Konzentration des Liganden, die im Vollblut bestimmt werden konnte (gebundener plus freier Anteil); entsprechend ist C_P die im Plasma und C_{RBC} die in den Erythrozyten enthaltene Konzentration. H ist der Hämatokrit.

Formt man diese Gleichung nach C_{RBC} um, so erhält man bei Kenntnis der übrigen Bindungsdaten diejenige Pharmakonmenge, die an die Erythrozyten gebunden wurde:

$$C_{RBC} = \frac{C_B - C_P}{H} + C_P, \qquad (2)$$

wobei der Hämatokrit mit 46,2 Vol % bestimmt wurde.

Für die in der Tabelle 7 wiedergegebenen Bindungsdaten der ß-Rezeptorenblocker an Erythrozyten wurden bei jeder Konzentration für jeden ß-Rezeptorenblocker die entsprechenden Daten der Vollblut- und der Plasmabindung in die obige Gleichung (2) eingesetzt und die erhaltenen Bindungswerte für die Erythrozytenbindung gemittelt.

Bei den so ermittelten Werten handelt es sich um Daten, die einer Bindung entsprechen, wie sie bei einer Gleichgewichtsdialyse gegen 100 Prozent rote Blutzellen analog der Bindung an Plasmaproteine theoretisch zu finden wäre.

Substanz	n	$\bar{x}$ in %	$\pm$ SEM
Atenolol	7	21,03	2,49
Practolol	7	41,84	4,44
Pindolol	7	68,60	3,55
d,l-Propranolol	7	90,42	2,95
d-Propranolol	nicht ermittelbar		
l-Propranolol	nicht ermittelbar		
Carazolol	4	94,92	1,63

Tabelle 7
Bindung der ß-Rezeptorenblocker an Erythrozyten, rechnerisch nach 3.3. ermittelt. Die Werte für d- und l-Propranolol konnten wegen fehlender Daten der Vollblutbindung nicht ermittelt werden. $\bar{x} \pm$ SEM ist die prozentuale Bindung der ß-Rezeptorenblocker an die Erythrozyten.

3.4. Bindung an Blutbestandteile im Kompartiment Vollblut

Die bisher bestimmten (HSA, Plasmaproteine, Vollblut) oder errechneten (Erythrozyten) Bindungsdaten sind, abgesehen von der Bindung an Vollblut, jeweils isoliert ermittelt worden, d.h. sie spiegeln nicht die Werte wider, wie sie physiologischen Gegebenheiten entsprechen. Bei der Gleichgewichtsdialyse gegen Plasma findet so beispielsweise weder der Hämatokrit noch die gegenseitige Beeinflussung der Bindung durch korpuskuläre Blutbestandteile Beachtung.

Ehrnebo et al. (1974) schlugen deshalb eine rechnerische Aufschlüsselung der Daten der Vollblutbindung vor, um so den Anteil bestimmen zu können, der im Vollblut an rote Blutzellen (λ_{RBC}) und Plasmaproteine (λ_{PP}) gebunden wird, sowie im Plasmawasser (λ_{PW}) ungebunden vorliegt.

Nach Ehrnebo ist:

$$\lambda_{PW} = \frac{C_P \cdot (1-f_P) \cdot (1-H)}{C_P} \qquad (1)$$

$$\lambda_{PP} = \frac{C_P \cdot f_P \cdot (1-H)}{C_B} \qquad (2)$$

$$\lambda_{RBC} = 1 - \frac{C_P \cdot (1-H)}{C_B}, \qquad (3)$$

wobei C_P die Gesamtkonzentration des ß-Rezeptorenblockers im Plasma (ermittelt nach 2.7.2., gebunden

plus frei), C_B die Gesamtkonzentration im Vollblut (ermittelt nach 2.7.3., gebunden plus frei), und f_P der Anteil von C_P ist, der an Plasmaproteine gebunden ist. H ist der Hämatokrit und betrug 0,46. Nach den Gleichungen 1 bis 3 wurden bei den untersuchten Konzentrationen jeweils die Einzelwerte korreliert und anschließend die Mittelwerte berechnet (Tabelle 8).

Substanz	n	λ_{PW}		λ_{PP}		λ_{RBC}	
		$\bar{x}$	$\pm$ SEM	$\bar{x}$	$\pm$ SEM	$\bar{x}$	$\pm$ SEM
Atenolol	7	45,15	1,89	2,07	0,70	52,76	1,79
Practolol	7	44,00	0,94	4,92	1,36	51,07	0,69
Pindolol	7	33,96	0,66	13,27	0,81	52,76	0,73
d,l-Propranolol	7	16,30	0,73	32,77	1,38	50,93	0,84
Carazolol	4	13,41	0,76	35,06	1,59	51,52	0,84

Tabelle 8

Aufschlüsselung der Vollblutbindung in Bindung an Plasmaproteine (λ_{PP}) und rote Blutzellen (λ_{RBC}) sowie des ungebundenen Anteils im Plasmawasser (λ_{PW}). Die Aufschlüsselung konnte nicht für die beiden Enantiomere des Propranolols durchgeführt werden, da die Daten der Vollblutbindung nicht bestimmt worden waren. $\bar{x}$ ist der prozentuale Bindungsanteil $\pm$ SEM.

3.5. Lipophilie der ß-Rezeptorenblocker

Die Ergebnisse der unter Punkt 2.9. beschriebenen Bestimmung der Verteilungskoeffizienten von Propranolol und Pindolol zwischen n-Octanol und Phosphat-Puffer bei pH 7,0 und pH 7,4 sind in Tabelle 9 wiedergegeben.

Eine Konzentrationsabhängigkeit der Verteilungskoeffizienten konnte nicht gefunden werden. Dies war im Prinzip auch nicht zu erwarten, da der Verteilungskoeffizient nur Ausdruck für die Lipophilie einer Substanz ist, die wiederum stoffspezifisch ist. Die erhaltenen Einzelwerte (jeweils Mittelwerte der Doppelbestimmungen) - bei pH 7,0 sowie 7,4 - wurden deshalb gemittelt.

Für die Korrelation der Bindung der untersuchten ß-Rezeptorenblocker an Eiweiße mit der Lipophilie, wie sie unter Punkt 3.6. beschrieben wird, wurden, da in dieser Arbeit von Atenolol, Practolol und Carazolol keine Verteilungskoeffizienten ermittelt werden konnten, für alle ß-Rezeptorenblocker die von Hellenbrecht et al. (s.u.) veröffentlichten Werte übernommen, die allerdings bei pH 7,0 und 20°C ermittelt worden sind, da Literatur über die Verteilungskoeffizienten der hier untersuchten ß-Rezeptorenblocker, ermittelt bei pH 7,4 und 37°C, nicht vorlag:

- Atenolol $P = 0{,}0033^{+}$
- Practolol $P = 0{,}022^{+}$
- Pindolol $P = 0{,}208^{+}$
- d,l-Propranolol $P = 5{,}39^{++}$
- Carazolol $P = 13{,}7^{+++}$

($^{+}$Hellenbrecht und Enenkel, 1976, $^{++}$Hellenbrecht et al., 1973, $^{+++}$Hellenbrecht, unveröffentlicht)

Die Korrelationsberechnungen mit den Bindungsdaten und den Verteilungskoeffizienten erlaubt auch für einen pH von 7,0 eine hinreichend genaue Aussage, da hierbei die Relation der unterschiedlichen Lipophilie der fünf ß-Rezeptorenblocker, ausgedrückt durch ihre Verteilungskoeffizienten, gewahrt bleibt. Bei pH 7,4 und 37°C wäre lediglich der jeweilige Absolutwert um etwa log 0,35 höher gewesen. Für Abbildung 11 hätte dies nur eine Parallelverschiebung der Regressionsgeraden zur Folge gehabt, nicht aber ihre Relation zueinander.

Substanz	pH	n	P	± SEM
Pindolol	7,0	5	0,285	0,012
Pindolol	7,4	5	0,563	0,008
d,l-Propranolol	7,0	5	6,118	0,182
d,l-Propranolol	7,4	5	14,425	0,678

Tabelle 9
Verteilungskoeffizienten P von Pindolol und Propranolol, ermittelt bei pH 7,0 und 7,4 bei 20°C. Durchführung wie unter Punkt 2.9. beschrieben. P ist der Mittelwert ± SEM aus den Bestimmungen von 5 verschiedenen Konzentrationen (0,5, 1, 5, 10 und 50 x 10^{-4} Mol/l), die wiederum jeweils Mittelwerte aus zwei voneinander unabhängigen Bestimmungen sind.

3.6. Korrelation zwischen Lipophilie und Bindung

Wie bereits gezeigt wurde, nimmt innerhalb einer homologen Reihe die Eiweißbindung der ß-Rezeptorenblocker mit deren Verteilungskoeffizienten als Charakteristikum des lipophilen Verhaltens zu.

Um diese Beziehung graphisch darzustellen, bietet sich die doppeltlogarithmische Korrelation der Lipophilie der Verbindungen mit ihren Bindungsdaten an. Dabei muß statt der prozentualen Bindung deren Verhältnis gebunden/ungebunden (b/f) verwendet werden, da anderenfalls keine Linearität der Daten zu erwarten ist (Hansch und Dunn, 1972). Die Korrelation der Daten ist in Abbildung 11 dargestellt. Die Gleichungen der Regressionsgeraden für diese Korrelation lauten:

Humanserumalbumin: $y = 0{,}3575\ x - 0{,}4259$
Plasmaproteine: $y = 0{,}5576\ x - 0{,}1497$
Vollblut: $y = 0{,}4032\ x - 0{,}2834$
Rote Blutzellen: $y = 0{,}5287\ x - 0{,}7248$

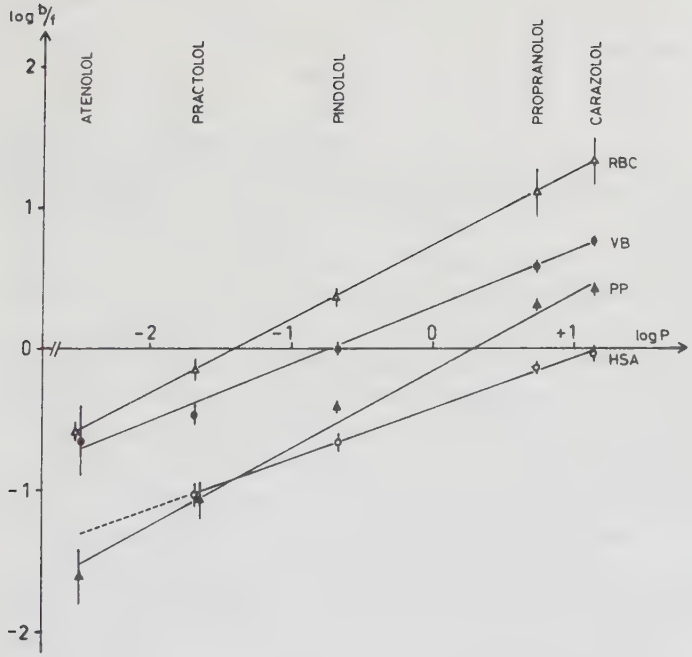

Abbildung 11
Korrelation der Verteilungskoeffizienten (log P) der ß-Rezeptorenblocker mit dem Quotienten gebunden/frei (log b/f) der Bindung an Humanserumalbumin (HSA o——o), Plasmaproteine (PP ▲——▲), Vollblut (VB ●——●) und rote Blutzellen (RBC Δ——Δ), wie unter Punkt 3.6. beschrieben. Die einzelnen Punkte sind Mittelwerte $\pm$ SEM (n = 7, außer Carazolol n = 4). Der log b/f-Wert für die Bindung von Atenolol an HSA konnte nicht dargestellt werden (siehe 3.2.1.): gestrichelte Linie. Die Gleichungen der Regressionsgeraden sind unter Punkt 3.6. wiedergegeben.

4. Diskussion der Ergebnisse

4.1. Zur Methodik

Wie bereits in den Erläuterungen zur Methodik ausgeführt, mußten bei der photometrischen Messung der Pharmakonzentration zum Teil erhebliche Schwierigkeiten überwunden werden, insbesondere die Interferenz mit adsorbierenden Blutbestandteilen (Albuminfehler, Plasmaproteinfehler, Vollblutfehler) und die mangelhafte Empfindlichkeit der photometrischen Meßmethode. So erklären sich im Vergleich zu Bindungsstudien mit radioaktiv markierten Verbindungen unüblich große Streuungen der Meßpunkte. Diese wiesen jedoch keinen gerichteten Trend auf, so daß sie als meßfehlerbedingte Streuungen angesehen werden konnten. Da weiterhin eine Konzentrationsabhängigkeit nicht bestand, konnten die Einzelergebnisse über alle Konzentrationen gemittelt werden. Zumindest diese Mittelwerte können als hinreichend gute Schätzung für die Bindungsaffinitäten der einzelnen Substanzen zu den jeweiligen Bindungspartnern angesehen werden.

Aus diesen Gründen wurde auch für die Regressionsberechnung (Punkt 3.6.) als einfachstes Modell lediglich ein linearer Zusammenhang angenommen und bezüglich HSA und Vollblutbindung bestätigt. Bei der Bindung an die Plasmaproteine zeigt sich eine möglicherweise gerichtete Abweichung der Mittelwerte von der angenommenen Linearität im Sinne eines leicht parabolen Verlaufs. Aus den oben genannten methodischen Gründen sollen diese Abweichungen allerdings nicht weitergehend interpretiert werden.

Im Gegensatz zu anderen Autoren wurde in der vorliegenden Untersuchung eine zum Teil beträchtliche Bindung der Substanzen an die Dialysemembran gemessen (Tabelle 3), mit Maximalwerten von etwa 11% für Carazolol. Daraus folgt, daß mit zunehmender Lipophilie der zu dialysierenden Substanzen auch deren Membranbindung mitberücksichtigt werden muß.

4.2. Ergebnisse der Bindungsstudien

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen eindeutig, daß zwischen der Bindung von ß-Rezeptorenblockern und einzelnen Blutbestandteilen eine klare, logarithmisch lineare Abhängigkeit zur Lipophilie der jeweiligen Verbindung besteht. Diese prozentuale Bindung ist im untersuchten Konzentrationsbereich unabhängig von der Konzentration, d.h. nicht sättigbar (vgl. Punkt 3.2.). Daraus folgt, daß spezifische Akzeptormoleküle z.B. mit hoher Affinität und niedriger Kapazität nicht betroffen sind, sondern daß es sich um Strukturen mit niedriger Affinität aber hoher Kapazität handeln muß. Derartige Bindungen an Plasmaproteine sind für Opioide verschiedener Lipophilie (Höllt und Teschemacher, 1975) sowie für den ß-Rezeptorenblocker Pindolol (Lemaire und Tillement, 1982) beschrieben worden und entsprechen den vorliegenden Daten.

Demgegenüber fanden sich in der Literatur insbesondere bei Verbindungen mit hoher Lipophilie, z.B. Propranolol oder auch bei Pindolol im klinisch verwendeten Dosierungsbereich wesentlich höhere Bindungswerte, die zudem deutlich konzentrationsabhängig waren: Die Bindung von Propranolol an Plasmaproteine, bzw. Serumproteine lag in einem Konzentrationsbereich von etwa 25 ng/ml bei ca. 80% (Evans et al., 1973, Johnsson und Regård, 1976, Henry und Mitchell, 1980, Glasson et al., 1980), wobei die Werte je nach Autor zwischen 79 und 97% variierten. Mit steigender Pharmakonzentration fiel die Größe der prozentualen Bindung exponentiell ab und betrug oberhalb von 5×10^4 ng/ml offensichtlich konstant und konzentra-

tionsunabhängig etwa 55%, wie dies Glasson et al. (1980) für Propranolol andeutungsweise zeigen konnten.

Dieser Trend im Hochdosisbereich entspricht den in dieser Arbeit gefundenen Ergebnissen: In einem Konzentrationsbereich von $0,7 \times 10^4$ bis $1,3 \times 10^6$ ng/ml konnte keine Konzentrationsabhängigkeit der Bindung gefunden werden; die durchschnittliche Höhe der Bindung von Propranolol an Plasmaproteine betrug 66%. Ähnliches konnte von Lemaire und Tillement (1982) für Pindolol gezeigt werden: Hier fiel die Bindung von etwa 48% bei 50 ng/ml auf 25% bei 5×10^4 ng/ml ab und schien sich andeutungsweise auf diesem Niveau zu stabilisieren; ein Wert, der in der vorliegenden Arbeit mit einer durchschnittlichen, konzentrationsunbhängigen Bindung von 28% über einen Konzentrationsbereich von $0,7 \times 10^4$ bis $1,2 \times 10^6$ ng/ml bestätigt werden konnte.

Anders waren die Verhältnisse bei der Bindung an Humanserumalbumin (HSA), die offensichtlich nur wenig konzentrationsabhängig ist: Glasson et al., 1980, fanden für Propranolol einen Abfall der Bindung von 55% (bei 0,25 ng/ml) auf etwa 50% (bei $2,5 \times 10^4$ ng/ml) und Lemaire und Tillement (1982) für Pindolol einen Abfall von 19% (bei 50 ng/ml) auf 16% (bei 5×10^4 ng/ml). Diese Werte korrespondieren mit den hier gefundenen Ergebnissen: Die Bindung an Humanserumalbumin war in einem Konzentrationsbereich von $0,7 \times 10^4$ bis $1,2 \times 10^6$ ng/ml nicht konzentrationsabhängig und lag für Propranolol bei 42% und Pindolol bei 18,5%.

Als Ursache für die hohe Pharmakonbindung an Plasmaproteine im niedrigen Pharmakonbereich, dem Abfall der pro-

zentualen Bindung bei steigender Pharmakonkonzentration und andererseits einer weitgehend konzentrationsunabhängigen Bindung an Humanserumalbumin wurde inzwischen eindeutig das saure α_1-Aminoglykoprotein identifiziert. Dieses Protein hat vorwiegend für basische Pharmaka, wie sie die ß-Rezeptorenblocker darstellen, eine sehr hohe Affinität, dargestellt als Bindungskonstante pro Mol Eiweiß, jedoch nur geringe Kapazität (Glasson et al., 1980, Sager et al., 1979, Belpaire et al., 1982, Lemaire u. Tillement, 1982). Die Konzentration dieses Proteins und damit auch die Bindung basischer Pharmaka, ist abhängig von verschiedenen Krankheitszuständen (Belpaire et al., 1982, Piafsky, 1980), jedoch insgesamt ab einem Konzentrationsbereich von etwa 1×10^5 ng/ml bei Propranolol (Glasson et al., 1980) und 5×10^4 ng/ml bei Pindolol (Lemaire u. Tillement, 1982) abgesättigt und somit bei Konzentrationserhöhung nicht mehr weiterhin wirksam. Im Vergleich zur Bindung an Humanserumalbumin aber ist die Bindung basischer Pharmaka an das α_1-Glykoprotein wegen der sehr viel niedrigen Plasmakonzentration dieses Proteins (etwa 20 µM) absolut gesehen wohl nicht von großer Bedeutung. Offensichtlich werden die bis jetzt untersuchten Pharmaka nur über eine einzige, sättigbare Bindungsstelle des α_1-Glykoproteins gebunden (Müller, 1982), die sich in der Darstellung nach Scatchard als Schnittpunkt mit der Abszisse ausweist.

Im Gegensatz dazu ist im Hochdosisbereich die Verteilung der ß-Rezeptorenblocker an die verschiedenen Blutbestandteile konzentrationsunabhängig und nicht abzusättigen, wie die gleichbleibenden Bindungswerte (z.B. in Prozent) oder der parallele Verlauf der Albuminbindung b/f im Scatchard-Diagramm ausweist.

Somit ergibt sich die Frage nach der Natur der Bindung der ß-Rezeptorenblocker an die verschiedenen Blutbestandteile. Da es sich bei den untersuchten ß-Rezeptorenblokkern um Isopropylamine handelt, die lediglich am aromatischen Ring unterschiedlich substituiert sind, können nur diese Substituenten für ein unterschiedliches Ausmaß von biologischer Bindung in Frage kommen. Diese unterschiedlichen Substituenten drücken sich aus als Unterschiede in der Verteilung von Octanol/Puffer-Quotienten und variieren um mehr als drei Zehnerpotenzen bei pH 7,0 (d.h. um das 4300fache).

Die Verbindungen besitzen demnach sehr unterschiedliche Fähigkeit, hydrophobe Wechselbeziehungen mit dem biologischen Material einzugehen, wie an der Zunahme der Bindung der ß-Rezeptorenblocker an Albumin, Plasma und Erythrozyten deutlich wird.

Durch eine enge Korrelation von log bound/free zum Logarithmus der Verteilungskoeffizienten (Abbildung 11) ist die Natur von hydrophoben Wechselwirkungen überprüfbar und im vorliegenden Falle nachzuweisen (Hansch und Fujita, 1964, Hansch und Dunn, 1972). Die Zunahme an Bindung an die einzelnen Blutbestandteile, d.h. die Steilheit der Korrelation log bound/free zu log P liegt bei allen Blutbestandteilen zwischen 0,4 bis 0,6. Sie steigt also folglich langsamer an, als es der Verteilung in einer reinen apolaren Phase (Octanol) nach der Fall wäre. Für die geringere Steilheit kommen entweder eine unterschiedliche Dissoziation der ß-Rezeptorenblocker in Frage oder Einflüsse, welche die volle Ausprägung hydrophober Wechselbindungen mindern. Da im vorliegenden Fall alle verwendeten Substanzen etwa gleich große pk_a-Werte der Amino-

gruppe aufweisen (etwa 9,7) (Heel und Avery, 1980), spielt der Dissoziationsgrad bei definiertem pH zwischen den Substanzen keine Rolle. Es ist vielmehr mit Hansch und Dunn (1972) anzunehmen, daß die Makromoleküle in der Biophase eine geringere Wasserhülle aufweisen und daher die hydrophobe Wechselwirkung der unpolaren Substituenten der ß-Rezeptorenblocker abschwächen. Als Ergebnis findet sich dann eine geringere Steigung der Regressionsgraden.

Interessanterweise sind ähnliche Steigungen gefunden worden, wenn die Verteilungskoeffizienten von ß-Rezeptorenblockern mit deren unspezifischen Membranwirkungen korreliert wurden, z.B. die Hemmung der myokardialen Erregbarkeit in vitro (Hellenbrecht et al., 1973, Sada und Ban, 1981) oder die unspezifische kardiodepressive Wirkung in vitro (Hellenbrecht et al., 1974). Es bestätigt sich somit die Vorstellung, daß ß-Rezeptorenblocker eine Änderung der Membrankonfiguration um so stärker hervorrufen, desto größer ihre Fähigkeit ist, sich mit den hydrophoben Anteilen der Verbindung in biologischen Makromolekülen oder erregbaren Membranen einzulagern (Hansch und Dunn, 1972).

Als weiterer Befund aus den vorliegenden Ergebnisse ergibt sich, daß sich alle ß-Rezeptorenblocker, unabhängig von ihrer Lipophilie, im Vollblut zu etwa gleichen Anteilen im Plasmaraum und im Erythrozytenkompartiment verteilt sind (λ_{RBC} = 50,9 - 52,7 , siehe Punkt 3.4.). Dieses Verhalten ist auf den ersten Blick überraschend, zumindest für die Verbindungen mit nur geringer Lipophilie (z.B. Atenolol oder Practolol), da deren Bestrebungen, hydrophobe Wechselbeziehungen mit der Bio-

phase einzugehen, nur gering sind. Es müssen daher andere treibende Kräfte als hydrophobe Wechselbeziehungen für die Verteilung in oder an die Erythrozyten wirksam gewesen sein. Diese ergeben sich zwanglos, wenn auch der Wassergehalt der einzelnen Kompartimente berücksichtigt wird. Voraussetzung ist allerdings, daß die Substanzen auch die Membranstruktur der Erythrozyten frei z durchdringen vermögen. Diese Voraussetzung ist vermutlich erfüllt, denn die Erythrozytenmembran ist für basische Moleküle geringer Größe relativ frei durchlässig (Schanker et al., 1961, Scha'afi et al., 1971), wobei die Dissoziation der Aminogruppe von großer Bedeutung ist (Brodie und Hogben, 1957, Ariëns und Simonis, 1977).

Wenn demnach beispielsweise Atenolol in hoher Konzentration im Plasmawasser vorliegt, dessen Raum etwa 0,5 des gesamten Blutvolumens beträgt (0,94 x (1-H), Dokumenta Geigy, Wissenschaftliche Tabellen), dann könnte sich diese polare Verbindung innerhalb des Erythrozyten in einem Raum von etwa 0,3 (0,65 x H, weil das Erythrozytenwasser 65% des Gesamterythrozyten ausmacht) verteilen, e sich ein Gleichgewicht zwischen dem ungebundenen Pharmakonanteil im Wasser der Erythrozyten und des Plasmas einstellen muß, entsprechend der treibenden Kraft des ursprünglichen Konzentrationsgefälles (Kurata und Wilkinson, 1974, Hughes et al., 1975). Der restliche Anteil von Atenolol im Erythrozyten müßte dann durch Anreicherung in der Biophase erklärt werden. Diese ergibt sich aus der Tatsache, daß Atenolol zwar eine geringe, aber nicht vernachlässigbare Bindung an die Proteinstrukturen aufweist (Plasmaproteinbindung etwa 3-4%, siehe Tabelle 5). Unter der Annahme, daß Atenolol

auch mit den Proteinstrukturen des Erythrozyten eine ähnliche quantitative Bindung eingeht, müßten im Erythrozytenraum absolut jedoch eine etwa 4,5fach größere Menge des Pharmakons gebunden werden als im Plasmaraum, da der Proteingehalt des Erythrozyten mit etwa 34,5% (Rappoport, 1969) im Vergleich zum Plasmaprotein (7,7%, vgl. Elektrophorese Abbildung 3) um diesen Faktor höher liegt.

Ob Atenolol auch an die Lipoidstrukturen der Biophase in bedeutsamem Ausmaß gebunden wird, ist in der vorliegenden Untersuchung nicht geprüft worden. Der sehr niedrige Octanol-Verteilungskoeffizient läßt allerdings vermuten, daß die Verteilung an Lipidstrukturen eher als niedrig angesehen werden kann.

Der Lipoidgehalt der Biophase könnte demgegenüber bei der Kompartimentalisierung von lipophilen Vertretern der ß-Rezeptorenblocker eine relativ große Rolle spielen. Unter der Annahme, daß der Gehalt an Lipoiden im Plasmaraum und im Erythrozyten etwa gleich hoch ist (etwa jeweils 580-600 mg/100 ml, Biological Handbook, 1961) und der zusätzlichen Annahme, daß die Bindung an diese Strukturen für den Plasmaraum und den Erythrozytenraum etwa vergleichbar hoch sind, sollte sich ein etwa vergleichbar hoher Anteil in jedem der beiden Kompartimente befinden. Dies ist, wie z.B. bei Propranolol und Carazolol gefunden, tatsächlich der Fall. Zusätzlich zu der Verteilung an die Lipoide, die jeweils nur einen geringen Anteil an den Kompartimenten einnehmen, sollten allerdings auch die Proteine als Bindungspartner in Frage kommen, wie aus dem Bindungsverhalten an Albumin und Plasma (Tabelle 4 und 5) zu erkennen ist. Auch hier

müßte sich der höhere Proteingehalt des Erythrozyten (34,5%) als treibende Kraft für die Verteilung der Verbindungen in das Erythrozytenkompartiment auswirken. Vermutlich besteht für lipophile Verbindungen zu den Lipidstrukturen eine zunehmend höhere Affinität als zu den reinen Albuminbestandteilen, da die Regressionsgerade für Gesamtplasma eine etwas größere Steigung aufweist als diejenige für HSA (Punkt 3.3. und Abbildung 11). Ein weiterer Verteilungsraum im Erythrozyten, der Wasserraum, wird vermutlich ebenfalls durch die Verbindungen eingenommen, ist aber im Verhältnis zu den polaren Substanzen kleiner, weil die Konzentration der lipophilen Verbindungen im Plasmawasser deutlich niedriger liegt, als diejenigen der polaren Verbindungen.

Die Ergebnisse zeigen somit, daß sich sowohl polare als auch unpolare ß-Rezeptorenblocker zu etwa gleichen Teilen im Erythrozytenraum verteilen. Dieses Verhalten wurde auch von Chau et al. (1977) für Pindolol und von Taylor und Turner (1981) für Atenolol beschrieben. Für Propranolol ergab sich demgegenüber eine geringere Verteilung in die Erythrozyten (Quotient der Konzentration im Erythrozyten zum Plasma je nach Autor 0,5 bis 0,8) (Evans et al., 1973, Evans und Shand, 1973, Lowenthal et al., 1974, Taylor und Turner, 1981). Andererseits fanden Sawchuk et al. (1974) eine signifikant höhere Konzentration von Propranolol in den Erythrozyten als im Plasma; der mittlere Quotient lag bei etwa 1,7. Diese Daten erklären sich aus dem unterschiedlichen Konzentrationsbereich der ß-Rezeptorenblocker in den zitierten Untersuchungen: Im niedrigen therapeutischen Bereich wirkt sich die sehr spezifische Bindungsstelle des

α_1-Glykoproteins in der Weise aus, daß relativ mehr Substanz von diesem Plasmabestandteil "festgehalten" wird und somit einem Übertritt in das Erythrozytenkompartiment entgegenwirkt. Andererseits sind die meisten der Bindungsstudien in-vivo-Untersuchungen, bei denen möglicherweise individuell unterschiedliche Proteinbindungen für die verschiedenen Bindungshöhen an die Kompartimente mitverantwortlich sind. Darüber hinaus sei an dieser Stelle noch einmal auf die methodologischen Untersuchungen von Cotham und Shand (1975) hingewiesen, in denen z.B. je nach verwendetem Blutentnahmegefäß eine signifikante Reduktion des Propranololgehaltes gefunden wurde: Bei der Verwendung von Glasgefäßen fand sich bezüglich der Propranolol-Konzentration ein Erythrozyten/Plasma-Quotient von 0,5,bei Plastik-Vakutainern von 2,74.

Die relativ konstante Verteilung der sehr unterschiedlich lipophilen ß-Rezeptorenblocker am Modell der Blutbestandteile findet ihre Entsprechung in der Verteilung dieser Stoffe in der Muskulatur von Ratten (Winkler, 1982, Lemmer et al., 1983, Lemmer et al., unveröffentlicht). Hier wurde gezeigt, daß sich Atenolol, Metoprolol und Propranolol trotz unterschiedlicher Lipophilie in etwa konstantem Verhältnis (etwa 3-5fach) im Gewebe gegenüber dem Plasmaraum verteilt. Die Muskulatur verhält sich somit ähnlich wie der Erythrozytenraum, d.h. wie ein Gewebe mit nur mäßig großem Anteil an Protein- und Lipidstrukturen, aber einem nicht geringen intrazellulären Wasserraum. Im Gegensatz dazu verteilen sich ß-Rezeptorenblocker mit hoher Lipophilie in relativ höherem Ausmaß in Biostrukturen mit höherem Anteil an Membranen, d.h. relativ geringerem Wasseranteil, wie z.B. Lungengewebe (Street et al., 1978, Hemsworth und Street,

1978, Lemmer, 1981) oder Hirngewebe (Neil-Dwyer et al., 1981, Lemmer, 1981, Lemmer et al., 1982). Dieses Bindungsverhalten entspricht dann eher demjenigen, welches bei Bindungsstudien an isolierte Erythrozytenmembranen für ß-Rezeptorenblocker gefunden wurde (Lemmer et al., 1972, Seeman, 1972). Vermutlich spielt für die hohe Bindungsaffinität der Phospholipidgehalt der Biophase eine Rolle, denn Ong et al. (1980) haben für Propranolol gezeigt, daß sich dieses an die phospholipidhaltigen intrazellulären Strukturen von Leberzellen anlagert, während die polaren Metaboliten von Propranolol im lipidarmen Cytosol zu finden sind.

Die klinische Relevanz der Ergebnisse könnte sich folgendermaßen ausdrücken: Für alle ß-Rezeptorenblocker ist zu erwarten, daß sie sich in hoher Dosierung, z.B. bei Intoxikationen im Blut zu gleichen Anteilen im Plasmaraum und Erythrozytenraum befinden. Die Möglichkeit von Entgiftungsmaßnahmen wird beispielsweise durch die Plasmaeiweißbindung vorgegeben. Geringe Eiweißbindungen wie z.B. bei Anteolol erlaubt eine effektive Anwendung der Hämodialysetechnik, wie bereits in klinischen Studien gezeigt wurde (Übersicht bei Knauf et al., 1981). Verbindungen mit hoher Lipophilie und somit hoher Plasmabindung, z.B. Carazolol oder Propranolol lassen sich demgegenüber wesentlich geringer dialysieren, zumal auch deren metabolische Clearance im Vergleich zur Dauer der Dialyse relativ rasch erfolgt. In dieser Situation wären solche Eliminationsmaßnahmen geeigneter, die auch bei hoher Plasmaproteinbindung wirksam sind, wie z.B. die Adsorption an Kohlepartikel oder Kunstharze in Form der Hämoperfusion. Darüber hinaus läßt sich aus den vorliegenden Ergebnissen aber auch als Hypothese ableiten, daß

unabhängig von der Lipophilie der Substanzen die Methode des Plasmaaustausches für eine Detoxfikation in Frage kommt: Pro Liter ausgetauschten Plasma müßten nach den vorliegenden Befunden jeweils etwa 50% des im Blut befindlichen ß-Rezeptorenblockers entfernt werden können, bei Austausch von Vollblut entsprechend die doppelte Menge. Dieses Verhalten sollte auch für die polaren Metaboliten gelten, wenn diese eine intakte Isopropylaminostruktur aufweisen, wie sie auch für die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Substanzen besteht. Ob letztlich solche Entgiftungsmaßnahmen auch klinisch effektiv sind, richtet sich schließlich auch nach der Größe des Verteilungsvolumens der Substanzen. Hier erweist sich die hohe Anreicherung der lipophilen Verbindungen in extravasale Kompartimente letztlich als limitierender Faktor für eine effektive Detoxifikation durch obengenannte Maßnahmen.

5. Zusammenfassung

Mit Hilfe der Gleichgewichtsdialyse wurde die Bindung der ß-Rezeptorenblocker Atenolol, Practolol, Pindolol, d-, l- und d,l-Propranolol in einem Konzentrationsbereich von $3 \cdot 10^{-4}$ bis $5 \cdot 10^{-3}$ Mol/l (entsprechend etwa $0{,}7 \cdot 10^{4}$ bis $1{,}3 \cdot 10^{6}$ ng/ml) und Carazolol in einem Konzentrationsbereich von $3 \cdot 10^{-4}$ bis $1 \cdot 10^{-3}$ Mol/l ($0{,}9 \cdot 10^{4}$ bis $1{,}5 \cdot 10^{6}$ ng/ml) an Humanserumalbumin (HSA) (4,2%), Plasmaproteine, Erythrozyten und Vollblut bestimmt.

In diesem Konzentrationsbereich war die Bindung der ß-Rezeptorenblocker an die verschiedenen Biophasen konstant, d.h. konzentrationsunabhängig. Die Bindung an HSA stieg aber innerhalb der homologen Reihe der ß-Rezeptorenblocker von etwa 9% bis auf 47% mit steigendem Octanol-Verteilungskoeffizienten an. Die Bindung an Plasmaproteine stieg ähnlich von 3% auf 72%, und die Vollblutbindung von 11% auf 85% an. Die daraus berechnete Bindung an die Erythrozyten bewegte sich von 21% bis 95%, je nach Lipophilie des ß-Rezeptorenblockers.

Die beobachtete relative Bindung war in allen Fällen (im Gegensatz zur in der Literatur beschriebenen Bindung im Niedrigdosisbereich) konzentrationsunabhängig und nicht sättigbar, woraus geschlossen werden konnte, daß es sich bei den bindenden Strukturen um solche mit niedriger Affinität, aber hoher Kapazität handeln muß. Die Natur der Bindung konnte durch die gute Korrelation zum Octanol-Verteilungskoeffizienten als hydrophobe Wechselbeziehung beschrieben werden.

Die Verteilung der ß-Rezeptorenblocker innerhalb von Vollblut betrug unabhängig von der Lipophilie 50% im Erythrozyten- und 50% im Plasmaraum. Daraus wurde geschlossen, daß sich alle ß-Rezeptorenblocker im Erythrozytenraum in etwa gleicher Weise verteilen wie im Plasmaraum, d.h. polare Verbindungen auch innerhalb der Zellwasserphase ungebunden vorliegen, während lipophile Substanzen in steigendem Ausmaß an die Zellbiophase gebunden werden.

6. Literaturverzeichnis

Appelgren, C., Borg, K.O., Elofsson, R., Johansson, K.A.: Binding of adrenergic beta-receptor antagonists to human serum albumin.
Acta Pharm. Suecica 11, 325-332 (1974)

Ariëns, E.J., Simonis, A.M.: Biologische Membranen als selektive Barrieren.
Pharmaz. Ztg. 122, 1723-1736 (1977)

Belpaire, F. M., Bogaert, M. G., Rossenau, M.: Bindung of ß-adrenoceptor blocking drugs to human serum albumin, to α_1-acid glycoprotein and to human serum.
Eur. J. Clin. Pharmacol. 22, 253-256 (1982)

Biological Handbook: Blood and other body fluids. D.S. Dittmer (Hrsg.), Fed.Amer.Soc.Exp.Biol, Washington 1961

Brodie, B., Hogben, A.: Some physico-chemical factors in drug action.
J. Pharm. Pharmacol. 9, 345-380 (1957)

Chau, N., Weiss, Y., Safar, M., Lavene, D., Georges , D., Milliez, P.: Pindolol availability in hypertensive patients with normal and impaired renal function.
Clin. Pharmacol. Ther., 22, 505-510 (1977)

Church, C., Hausch, C.: Notes on the determination of partition coefficients.
Pomona College, Department of Chemistry, Claremont, California (unveröffentlicht)

Cotham, R. H., Shand, D.: Spuriously low plasma propranolol concentrations resulting from blood collecting methods.
Clin. Pharmacol. Ther. 18, 535-538 (1975)

Cruickshank, J. M.: The clinical importance of cardio-selectivity and lipophilicity in beta blockers.
Amer. Heart J. 100, 160-178 (1980)

Cruze, C. A., Meyer, M. C.: Binding of salicylate and sulfathiazol by whole blood constituents. J. Pharm. Sci. 65, 33-37 (1976)

Daniel, F. K.: In: Kirk, R. F., Othmer, D. F. (Hrsg.): Encyclopedia of chemical technolgy, Vol. 5. Interscience Enxyclopedia, New York, 1950

Dianorm: Gleichgewichts-Dialyse-System, Anleitung für Bindungsstudien (1973). Diachema AG, Birmensdorf/Zürich

Dokumenta Geigy, Wissenschaftliche Tabellen. 6. Aufl., 1960

Eckert, Th., Ibrahim, A. M., Funcke, H. J.: Zur Frage des Rückhalteeffekts bei Membranfiltern vom Celluloseestertyp. Pharm. Acta Helv. 48, 628-638 (1973)

Ehrnebo, M., Agurell, S., Boréns, L. O., Gordon, E., Lönroth, U.: Pentazocine binding to blood cells and plasma proteins. Clin. Pharmacol. Ther. 16, 424-429 (1974)

Evans, G. H., Nies, A. S. Shand, D. G.: Disposition of Propranolol. III. Decreased half-life and volume of distribution as a result of plasma binding in man, monkey, dog and rat. J. Pharmacol. Exp. Ther. 186, 114-122 (1973)

Evans, G.H., Shand, D.G.: Disposition of propranolol. VI. Independent variation in steady state circulating drug concentrations and half-life as a result of plasma drug binding in man. Clin. Pharmacol. Exp. Ther. 14, 494-500 (1973)

Glasson, S., Zini, R., d'Athis, P., Tillement, J. P., Boissier, J. R.: The distribution of bound propranolol between the different human serum proteins. Mol. Pharmacol. 17, 187-191 (1980)

Hansch, C., Fujita, T.: ρ-σ-π-Analysis. A method for the correlation of biological activity and chemical structure.
J. Amer. chem. Soc. 86, 1616-1626 (1964)

Hansch, C., Dunn III, W.: Linear relationships between lipophilic character and biological activity of drugs.
J. Pharm. Sci. 61, 1-19 (1972)

Heel, R. C., Avery, G. S.: Appendix A: Drug data information. In: Avery, G. S. (Hrsg.): Drug treatment, 2. Aufl., S. 1211-1222.
Adis Press, Sidney. New York, 1980

Hellenbrecht, D., Müller, K.-F.: ß-Sympatholytics as non-specific inhibitors of serum cholin-esterase.
Experientia 29, 1255-1257 (1973)

Hellenbrecht, D., Lemmer, B., Wiethold, G., Grobecker, H.: Measurement of hydrophobility, surface activity, local anaesthesia, and myocardial conduction velocity as quantitative parameters of the non specific membrane affinity of ß-adrenergie blocking agents.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 277, 211-226 (1973)

Hellenbrecht, D., Müller, K.-F., Grobecker, H.: Prediction of the non-specific cardiodepressant effects of ß-adrenoceptor blocking agents in vitro and in vivo by means of the Hansch-analysis.
Eur. J. Pharmacol. 29, 223-235 (1974)

Hellenbrecht, D. Enenkel, J.: Estimation of the non-specific cardiodepressant potency of ß-adrenergic blocking drugs propranolol, pindolol, practolol and atenolol.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 293, R 22 (1976)

Hellenbrecht, D., Gortner, L.: Correlations between hydrophobicity and non-specific pharmacological effects of ß-adrenoceptor blocking drugs.
Pol. J. Pharmacol. Pharm. 28, 625-630 (1976)

Hemsworth, B. A., Street, J. A.: Accumulation of beta-adrenoceptor antagonists in the lung.
VIIth, Int. Congr. Pharmacol., Paris, Juli, 1978

Henry, J. A., Mitchell, S. N.: Effect of pH on human plasma protein binding of a series of ß-adrenoreceptor antagonists.
Proc. Brit. Pharmacol. Soc. 119 P-120 P, 10.-12. Sept., 1980

Henry, J. A., Dunlop, A. W., Mitchell, S. N., Turner, P., Adams, P.: A model for the ph-dependence of drug-protein binding.
J. Pharm. Pharmacol. 33, 179-182 (1981)

Hind, H. W., Goyan, F. M.: In: Münzel, K., Büchi, J., Schultz, O.-E.: Galenisches Praktikum, S. 121-124, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 1959.
J. Amer. Pharm. Ass. 36, 33 (1947)

Höllt, v., Teschemacher, Hj.: Hydrophobic interactions responsible for unspecific binding of morphine-like drugs.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 288, 163-177 (1975)

Hughes, I. E., Ilett, K. F., Jellett, L. B.: The distribution of quinidine in human blood.
Brit. J. clin. Pharmac. 2, 521-525 (1975)

Johnsson, G., Regårdh, C.-G.: Clinical pharmacokinetics of ß-adrenoreceptor blocking drugs.
Clin. Pharmacokin. 1, 233-263 (1976)

Knauf, H., Schäfer-Korting, M., Mutschler, E.: Pharmakokinetik und biologische Wirkdauer von ß-Rezeptorenblockern bei Niereninsuffizienz.
Internist 22, 616-621 (1981)

Koch-Weser, J., Seelers, E.: Binding of drugs to serum albumin.
New Engl. J. Med. 294, 311-316 (1976)

Krieglstein, J.: Zur Plasmaproteinbindung von Arzneimitteln.
Klin. Wschr. 47, 1125-1130 (1969)

Krieglstein, J.: Bestimmungsmethoden, physikochemische Grundlagen und pharmakokinetische Bedeutung der Plasmaproteinbindung von Arzneimitteln
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 23, 1527-1529 (1973)

Krieglstein, J.: Die Bedeutung der Lipophilie von Arzneimitteln für deren Verteilung im Organismus.
Dtsch. Med. Wschr. 98, 1509-1510 (1973)

Kubinyi, H.: Lipophilicity and biological activity.
Arzneim. Forsch. (Drug Res.) 29 (II), 1067-1080 (1979)

Kurata, D., Wilkinson, G. R.: Erythrocyte uptake and plasma binding of diphenylhydantoin.
Clin. Pharm. Therap. 16, 355-362 (1974)

Lemaire, M., Tillement, J. P.: The binding characteristics of some adrenergie beta-receptor antagonists to human serum proteins.
Biochem Pharmacol. 31, 359-365 (1982)

Lemmer, B.: Pharmakokinetics of ß-adrenoceptor blocking drugs of different polarity (propranolol, metoprolol, atenolol) in plasma and various organs of the light-dark-synchronized rat.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 316, R 60 (1981)

Lemmer, B.: Pharmakologische Grundlagen der Therapie der koronaren Herzerkrankung mit Beta-Adrenozeptoren-blockern.
Herz 7, 168-178 (1982)

Lemmer, B., Wiethold, G., Bak, I. J., Hellenbrecht, D., Grobecker, H.: Human blood platelets and erythrocytes as cellular models for investigation of membran active drugs.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 275, 299-313 (1972)

Lemmer, B., Bathe, K.: Differences in acute and steady-state kinetics of racemic propranolol and its enantiomers in plasma, heart and brain of the light-dark-synchronized rat.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 307, R 61 (1979 a)

Lemmer, B., Bathe, K.: Pharmakokinetics of propranolol (racemic, enantiomers) in various tissues of the light-dark-synchronized rat.
XIV. Int. Conf. Int. Soc. Chronobiol., Hannover 8.-12.7.1979.
In: Chronobiologia 6, 126 (1979 b)

Lemmer, B., Bathe, K.: Stereospecific and circadian-phase-dependent kinetic behaviour of dl-, l- and d-propranolol in plasma, heart and brain of light-dark-synchronized rats.
J. Cardiovasc. Pharmacol. 4, 635-644 (1982)

Lemmer, B., Winkler, H., Neumann, G.: Beta-adrenoceptor blocking drugs: correlations between lipophilicity, brain concentrations and decrease in motor activity in synchronized rats.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 321, R 20 (1982)

Lemmer, B., Winkler, H., Neumann, G., Fink, M.: Zur Chronopharmakologie von ß-Rezeptorenblockern: Tageszeitabhängigkeit in der Pharmakokinetik und in der Wirkung auf die Motilität bei Ratten.
1. Gesamtkongreß der pharmazeutischen Wissenschaften, München, 17.-20. April 1983

Leo, A., Hansch, C., Elkins, D.: Partition coefficients and their uses.
Chem. Rev. 71, 525-616 (1971)

Lowenthal, D., Briggs, W., Gibson, T., Nelson, H., Cirkensa, J.: Pharmacokinetics of oral propranolol in chronic renal disease.
Clin. Pharmacol. Ther. 16, 761-769 (1974)

Minder, R., Weder, H. G., Bickel, H. M.: Experimental errors resulting from uptake of lipophilic drugs by soft plastic material.
Biochem. Pharmacol. 19, 2179-2180 (1970)

Müller, W. E.: Die Plasmaproteinbindung von Pharmaka.
Med. Mo. Pharm. 5, 302-310 (1982)

Neil-Dwyler, G., Bartlett, J., McAinsh, J., Cruickshank, J.: ß-adrenoceptor blockers and the blood-brain barrier.
Brit. J. clin. Pharmac., 11, 549-553 (1981)

Niedner, R., v. Oettingen, U., Meyer, F.: Wechselwirkungen von Phenprocoumon (Marcumar) mit Humanserumalbumin, Erythrozyten und Blut.
Int. J. Clin. Pharm. 12, 446-457 (1975)

Olaisen, B., Øye, J.: Interactions of membrane stabilizing drugs affecting human erythrocytes in vitro.
Eur. J. Pharmacol. 22, 112-116 (1973)

Ong, H., du Souich, P., Marchand, C.: Intracellular distribution of propranolol and its metabolites in rat liver.
Pharmacologist 22, 187 (1980)

Piafsky, K. M.: Disease-induced changes in the plasma-binding of basic drugs.
Clin. Pharmacokin. 5, 246-262 (1980)

Raaflaub, J.: Über die Beziehung zwischen der Lipidlöslichkeit von Pharmaka und ihrem pharmakokinetischen Verhalten.
Experientia 26, 457-467 (1970)

Regårdh, C. G.: Pharmakokinetics of ß-blockers. In: Berglund, Hansson, L., Werkö, L.: Pathophysiology and management of arterial hypertension. S. 168-174.
Proceedings of a conference, Denmark, Copenhagen, 10-11. April, 1975

Rappoport, S. M.: Medizinische Biochemie, 5. Aufl., VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin, 1969

Sada, H., Ban, T.: Time-independent effects on cardiac action potential upstroke velocity (resting block) and lipid solubility of beta adrenergic blockers.
Experientia 37, 171-172 (1981)

Sager, G., Nilsen, O. G., Jacobsen, S.: Variable binding of propranolol in human serum.
Biochem. Pharmac. 28, 905-911 (1979)

Sager, G., Jacobsen, S.: Plasma dependent adrenergic ligand binding to human erythrocytes.
Biochem. Pharmacol. 28, 2167-2173 (1979)

Sawchuk, R. J., Robayo, J., Miller, K. W.: The distribution of propranolol between blood and plasma in hypertensive patients.
Brit. J. Clin. Pharmacol. 1, 440-442 (1974)

Seeman, P.: The membrane actions of anesthetics and tranquilizers.
Pharmacol. Rev. 24, 583-655 (1972)

Sha'afi, R. J., Gary-Bobo, C. M., Solomon, A. K.: Permeability of red cell membranes to small hydrophilic and lipophilic solutes.
J. Gen. Physiol. 58, 238-258 (1971)

Schanker, L. S., Nafpliotis, P. A., Johnson, J. M.: Passage of organic bases into human red cells.
J. Pharm. Exp. Ther. 133, 325-331 (1961)

Schildknecht, J., Weder, H. G.: Die Messung der Versuchsparameter am Beispiel Dibenzepin mit einer von uns entwickelten Gleichgewichts-Dialyse-Apparatur.
1st Eur. Biophys. Congr., Baden, Austria (1971)

Scholtan, W.: Bindung der Antibiotika an die Eiweißkörper des Serums. 3. Mitteilung: Theorie und Gesetzmäßigkeiten der Eiweißbindung von Antibiotika.
Arzneim.-Forsch. 13, 347-360 (1963)

Scholtan, W.: Die Bindung der Sulfonamide an Eiweißkörper. 4. Mitteilung: Konzentrations- und Temperaturabhängigkeit der Eiweißbindung.
Arzneim.-Forsch. 14, 1139-1146 (1964)

Scholtan, W.: Bestimmungsmethoden und Gesetzmäßigkeiten der Serumproteinbindung von Arzneimitteln.
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 28 (II), 1037-1047 (1978)

v. Schwarzenfeld, J.: Plasmaeiweißbindung.
Pharmazie 29, 497-505 (1974)

Street, J. A., Conda, I., Parkinson, H., Hemsworth, B. A.: Lung accumulation of some ß-adrenoceptor antagonists.
J. Pharm. Pharmac. 30, 56 P (1978)

Taylor, E. A., Turner, P.: The distribution of propranolol, pindolol and atenolol between human erythrocytes and plasma.
Brit. J. clin. Pharmac. 12, 543-548 (1981)

Weder, H. G., Bickel, M. H.: Verbessertes Gerät zur Gleichgewichts-Dialyse.
Z. Anal. Chem. 252, 253-255 (1970

Weder, H. G., Schildknecht, J., Kesselring, P.: A new equilibrium dialyzing system.
Amer. Labrotory, 10, 15-21 (1971)

Wiethold, D., Hellenbrecht, D., Lemmer, B., Palm, D.: Membrane effects of beta-adrenergic blocking agents: investigations with the fluorescence probe 1-anilino-8-naphtalene sulfonate (ANS) and antihemolytic activities.
Biochem. Pharmacol. 22, 1437-1449 (1973)

Winkler, H.: Untersuchungen zur Pharmakokinetik von ß-Adrenozeptorenblockern unterschiedlicher Polarität - Propranolol, Metoprolol, Atenolol - im Plasma und verschiedenen Organen der licht-dunkel-synchronisierten Ratte mittels einer neu entwickelten Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographischen Methode.
Inauguraldissertation, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main, 1982

Woods, P. B. Robinson, M. L.: An investigation of the comparative liposubilities of ß-adrenoreceptor blocking agents.
J. Pharm. Pharmacol. 33, 172-173 (1981)

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die dem Fachbereich Humanmedizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

Die Bindung
von ß-Rezeptorenblockern
an Humanserumalbumin, Plasmaproteine,
Erythrozyten und Vollblut
in Abhängigkeit
von ihrer Lipophilie

im Zentrum der Pharmakologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main unter der Leitung von Priv.-Doz. Dr. med. D. Hellenbrecht ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Durchführung der Arbeit keine anderen als die in dieser Arbeit aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Frankfurt am Main, den 21. März 1983

Detlef Schulz

Lebenslauf

06.11.1949	Geboren in Düsseldorf als Sohn von Gerda und Georg Schulz
1956 bis 1957	Besuch der Volksschule in Wilhelmshaven
1957 bis 1961	Besuch der Volksschule in Düsseldorf
1961 bis 1967	Besuch des Mercator-Gymnasiums in Duisburg
1967 bis 1969	Besuch der Carl-Schurz-Schule in Frankfurt am Main
03.06.1969	Abitur
1969 bis 1971	Pharmazeutisches Praktikum in der Weißfrauen- und in der Einhorn-Apotheke, Frankfurt
09.07.1971	Pharmazeutische Vorprüfung
1971 bis 1972	Studium der Chemie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt
1972 bis 1975	Studium der Pharmazie an der gleichen Universität
22.01.1976	Approbation als Apotheker
1975 bis 1982	Studium der Humanmedizin an der gleichen Universität
07.06.1982	Approbation als Arzt

Detlef Schulz